



**Daniela Martins Flório**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Produção de Microesferas de  
Nanocompósitos de Quitosano e Argila  
para Libertação Controlada de  
Fármacos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: João Paulo Miranda Ribeiro Borges, PhD, FCT-UNL  
Co-orientador: Ana Patrícia Correia Almeida, MSc, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca  
Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar Oliveira Ricardo  
Vogais: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges  
MSc Ana Patrícia Correia Almeida



**FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**Outubro 2013**



**Daniela Martins Flório**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Produção de Microesferas de  
Nanocompósitos de Quitosano e Argila  
para Libertação Controlada de  
Fármacos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: João Paulo Miranda Ribeiro Borges, PhD, FCT-UNL  
Co-orientador: Ana Patrícia Correia Almeida, MSc, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca  
Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar Oliveira Ricardo  
Vogais: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges  
MSc Ana Patrícia Correia Almeida

**Outubro 2013**



# **Produção de Microesferas de Nanocompósitos de Quitosano e Argila para Libertação Controlada de Fármacos**

Copyright © 2013- Todos os direitos reservados. Daniela Martins Flório; Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“Que seja a minha noite uma alvorada...”*  
*Florbela Espanca*





## AGRADECIMENTOS

No momento da conclusão deste trabalho, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este fosse possível.

Ao meu orientador, Professor João Paulo Borges, e ao professor Jorge Silva um muito obrigada por todo o incentivo e disponibilidade demonstrados. Acima de tudo agradeço-lhes pela partilha de conhecimentos.

À minha Co-orientadora, MSc Ana Almeida, e ao seu “Projeto Especial” um agradecimento reforçado por toda a paciência e dedicação, por nunca me ter deixado desistir e por todas as noites mal dormidas.

A todo Grupo de Polímeros e Materiais Mesomorfos do Departamento de Ciências dos Materiais, por me terem recebido e integrado da melhor forma possível, por toda a ajuda a nível laboratorial e por todo o companheirismo.

A todos os meus “Biocolegas” porque sem eles estes anos não teriam, com certeza, sido os mesmos. Em especial às “Fantastic Four” pela amizade e carinho.

Ao meu namorado, João, que mesmo estando longe esteve sempre por perto, um muito obrigado.

Por último, porque os últimos são sempre os primeiros, à minha família que me apoiou sempre e me fez acreditar em mim. Em especial aos meus pais um muito muito obrigado por todo o carinho e dedicação e por me terem tornado na pessoa que sou. À minha mãe que me fez acreditar em super-heróis e ao meu pai que me fez acreditar em Anjos, dedico este trabalho.



## RESUMO

A libertação controlada de fármacos tem, atualmente, sido alvo de uma significativa atenção. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho é a preparação e desenvolvimento de vários sistemas de libertação controlada de fármacos, tendo em vista diferentes aplicações, como a libertação específica no cólon ou a libertação localizada e prolongada *in situ*. Foram, então, preparadas por intercalação em solução e reticulação iónica uma série de microesferas de compósitos (ME) de quitosano / argila / ácido acetilsalicílico com propriedades únicas.

A estrutura das ME produzidas foi caracterizada utilizando espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios-X (DRX). Foi observado que, o grau de inchamento e a degradação das esferas são influenciados pelo pH do meio em estudo (SGS a pH 1.2 e PBS a pH 7.4), bem como pelo teor de argila utilizado. Comparado com as ME de QS, a incorporação da argila diminuiu a eficácia de encapsulação da droga e, aumentou o grau de inchamento e a taxa de libertação da droga. Em pH 1.2 todas as ME sofreram degradação. No entanto, em pH 7.4 não foi visível qualquer degradação das ME mesmo após 10 dias de imersão. Em PBS após este período de tempo, a maioria dos sistemas ainda não tinha libertado todo o fármaco encapsulado, sendo este comportamento um indicativo da sua aplicabilidade em sistemas de libertação prolongada.

Além disso, e uma vez que estes sistemas têm como objetivo aplicação biomédica, foram realizados testes de citotoxicidade em células Vero e observou-se que as argilas apresentam baixa citotoxicidade.

O estudo aponta para o potencial da aplicação destas ME híbridas enquanto sistemas de libertação controlada de fármacos.

**Termos-chave:** Sistemas de libertação controlada de fármacos, Quitosano, Argila, Compósitos, Microesferas.



## ABSTRACT

Controlled drug release is presently gaining significant attention. In this regard, the main purpose of this work is the preparation and development of several controlled drug delivery systems suitable for different applications, like for colon-specific drug delivery or for the localized and prolonged delivery of drugs. So, a series of composite microspheres (ME) of Chitosan/Clay/Acetylsalicylic-acid with unique properties were prepared by solution intercalation and ionic cross-linking.

The structure of the produced ME were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). The swelling and degradation of the ME was noticed to be influenced by the pH of the different test medium used (SGF pH 1.2 and PBS pH 7.4) as well as by the clay content used. Compared to CS ME, the incorporation of clay decreased the drug encapsulation efficiency and, increased the swelling behavior and drug release. In pH 1.2 all the ME have been degraded. However, in pH 7.4 no notable disintegration was visually observed for the ME even after 10 days of immersion. In PBS at the end of 10 days most systems have not yet released the entire encapsulated drug, allowing us to deduce its applicability as sustained release systems.

In addition and since these systems will have a biomedical application, cytotoxicity tests were carried out in Vero cells and it was observed that the clays show low cytotoxicity.

The study points out to the potential application of these hybrids ME as drug delivery systems.

**Keywords:** Controlled delivery systems, Chitosan, Clay, Composites, Microspheres.



# ÍNDICE REMISSIVO

AGRADECIMENTOS .....	I
RESUMO .....	III
ABSTRACT .....	V
ÍNDICE REMISSIVO .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE TABELAS .....	XV
ÍNDICE DE EQUAÇÕES .....	XVII
LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS .....	XIX
INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	1
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
1.1. SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS (SLC).....	3
1.1.1. Microesferas em libertação controlada de fármacos.....	6
1.1.2. Nanocompósitos de quitosano e montmorilonite na libertação controlada de fármacos.....	8
1.1.3. Mecanismos de libertação de fármaco em SLC de base polimérica biodegradável.....	17
1.2. FÁRMACO MODELO .....	19
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>21</b>
2.1. MATERIAIS .....	21
2.2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....	22
2.2.1. Preparação das dispersões precursoras das microesferas .....	22
2.2.2. Produção das microesferas .....	26
2.2.3. Liofilização das microesferas reticuladas ionicamente .....	28
<b>3. TÉCNICAS DE CARATERIZAÇÃO .....</b>	<b>31</b>
3.1. CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL.....	31
3.1.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR- FTIR).....	31
3.1.2. Difração de Raios X (DRX).....	32
3.2. CARATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	34

3.2.1.	<i>Microscopia Ótica (MO)</i> .....	34
3.2.2.	<i>Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)</i> .....	34
3.3.	GRAU DE INCHAMENTO (SWELLING) .....	35
3.4.	EFICÁCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACO (EE) E PERFIL DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO <i>IN VITRO</i> (DRUG RELEASE) DAS MICROESFERAS DE QUITOSANO/ARGILA/ÁCIDO ACETILSALICÍLICO.....	36
3.4.1.	<i>Eficácia de Encapsulação de Fármaco</i> .....	39
3.4.2.	<i>Perfil de Libertação Controlada de Fármaco</i> .....	40
3.5.	TESTES DE CITOTOXICIDADE .....	42
<b>4.</b>	<b>ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS .....</b>	<b>47</b>
4.1.	CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL.....	47
4.1.1.	<i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR- FTIR)</i> .....	47
4.1.2.	<i>Difração de Raios X (DRX)</i> .....	54
4.2.	CARATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	57
4.2.1.	<i>Microscopia Ótica (MO)</i> .....	57
4.2.2.	<i>Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)</i> .....	59
4.3.	GRAU DE INCHAMENTO (SWELLING) .....	62
4.4.	EFICÁCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACO (EE) E PERFIL DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO <i>IN VITRO</i> (DRUG RELEASE) DAS MICROESFERAS DE QUITOSANO/ARGILA/ÁCIDO ACETILSALICÍLICO.....	64
4.4.1.	<i>Eficácia de Encapsulação de Fármaco (EE)</i> .....	64
4.4.2.	<i>Perfil de Libertação Controlada de Fármaco in vitro (Drug Release)</i> .....	66
4.5.	TESTES DE CITOTOXICIDADE .....	71
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>87</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Esquema do efeito da concentração de fármaco no organismo através da utilização de diferentes métodos de administração. Adaptado de [8].	4
Figura 2- Fatores interdependentes considerados no desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de fármacos [11].	5
Figura 3- Possíveis morfologias das micropartículas. Adaptado de [16]	6
Figura 4- Ilustração esquemática da versatilidade do quitosano. A pH baixo os grupos amina do quitosano estão protonados conferindo-lhe um comportamento policatiónico. Adaptado de [22].	9
Figura 5- Estrutura da montemorilonite de sódio Adaptado de [40].	11
Figura 6- Esquema ilustrativo da modificação química da argila. Adaptado de [35].	12
Figura 7- Possíveis aplicações biomédicas dos nanocompósitos de polímero-filossilicatos. Adaptado de [52]	14
Figura 8- Esquema ilustrativo da intercalação do quitosano na distância interlamelar da montemorilonite. Adaptado de [2].	15
Figura 9- Esquema dos diferentes tipos de compósitos resultantes da interação entre filossilicatos e polímeros: (a) compostos reforçados por micropartículas (aglomerados de nanoargilas), (b) nanocompósito intercalado e (c) nanocompósito esfoliado. Adaptado de [36].	17
Figura 10- Esquema ilustrativo da degradação das cadeias poliméricas, com consequente libertação de fármaco. Adaptado de [8].	18
Figura 11- Esquema representativo da erosão (a) superficial, e (b) volúmica. Adaptado de [8].	18
Figura 12- Mecanismos de libertação de fármaco em microesferas de base biodegradável polimérica. Adaptado de [60]	19

Figura 13- Mecanismo de hidrólise do ácido acetilsalicílico. ....	20
Figura 14- Esquema representativo da obtenção de nanocompósitos pelo método de intercalação em solução. Adaptado de [34]. ....	23
Figura 15-Esquema representativo da interação entre o quitosano e o tripolifosfato de sódio [8]. ....	26
Figura 16- Montagem experimental utilizada na produção das ME. Onde: A- Bomba infusora (KD SCIENTIFIC 100); B- Seringa (B.BRAUN Injekt de 10mL de volume) e agulha (G25); C- Tina; D- Agitador orbital (IKA-VIBRAMAX-VRX). ....	27
Figura 17- Liofilizador VaCo 2, Zirbus technology. ....	29
Figura 18- Esquema elucidativo da aplicação da transformada de Fourier [70]. ....	31
Figura 19-Difratogramas exemplificativos dos três tipos de compósitos resultantes da interação entre filossilicatos e polímeros. Adaptado de [40]. ....	33
Figura 20- Reta de calibração utilizada no estudo da eficácia de encapsulação de fármaco. Absorvância no comprimento de onda de 296nm em função da concentração de AAS em TPF (mg/mL).....	38
Figura 21- Reta de calibração utilizada no estudo do perfil de libertação de fármaco in vitro. Absorvância no comprimento de onda de 296nm em função da concentração de AAS em PBS (mg/mL).....	38
Figura 22- Reta de calibração utilizada no estudo do perfil de libertação de fármaco in vitro. Absorvância no comprimento de onda de 296nm em função da concentração de AAS em HCl (mg/mL).....	39
Figura 23- Esquema representativo da microplaca de 96 poços utilizada para os testes de citotoxicidade das amostras M0N, M4N, C10A e C15A. ....	45
Figura 24- Esquema representativo da microplaca de 96 poços utilizada para os testes de citotoxicidade das amostras C20A, C30B e C93A. Onde se encontram também os controlos de células (C.C.) e de meio (C.M.). ....	45
Figura 25- Espetros de FTIR do QS e da amostra M0N. ....	47
Figura 26- Espetros de FTIR do QS, da argila Nanofil 116® e da amostra M4N. ....	49

Figura 27- Espectros de FTIR das amostras M1N, M2N, M3N, M4N e M5N. ....	50
Figura 28- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite10A® e da amostra C10A.....	51
Figura 29- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite15A® e da amostra C15A .....	51
Figura 30- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite20A® e da amostra C20A.....	51
Figura 31- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite30B® e da amostra C30B. ....	51
Figura 32- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite93A® e da amostra C93A. ....	52
Figura 33- Difrátogramas do QS, AAS, da argila Nanofil ®116 e da amostra AASM4N.....	54
Figura 34- Difrátogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®10A e da amostra AASC10A.....	54
Figuras 35- Difrátogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®15A e da amostra AASC15A.....	55
Figura 36- Difrátogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®20A e da amostra AASC20A.....	55
Figura 37- Difrátogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®30B e da amostra AASC30B.....	55
Figura 38- Difrátogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®93A e da amostra AASC93A.....	55
Figura 39- Diâmetros das ME: AASM0N, AASM1N, AASM2S, AASM3N, AASM4N e AASM5N... ..	58
Figura 40- Diâmetros das ME: AASM4N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B e AASC93A.....	58
Figura 41- Imagens obtidas com recurso à MO (ampliação de 5x) de: A)- AASM0N; B)- AASM4N. ....	59
Figura 42- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASM0N com uma ampliação de 500x; B) Superfície da amostra AASM1N com uma ampliação de 1000x. ....	60
Figura 43- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASM2N com uma ampliação de 1000x; B) Superfície da amostra AASM3N com uma ampliação de 1000x. ....	60
Figura 44- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASM4N com uma ampliação de 1000x; B) Superfície da amostra AASM5N com uma ampliação de 1000x. ....	60
Figura 45- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASC10A com uma ampliação de 1000x; B) Superfície da amostra AASC15A com uma ampliação de 1000x..	61
Figura 46- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASC20A com uma ampliação de 1000x; B) Superfície da amostra AASC30B com uma ampliação de 1000x..	61
Figura 47- Imagem da superfície de AASC93A, ampliada 1000x obtida com recurso a MEV.....	61

Figura 48- Grau de inchamento em função do tempo das ME de QS/MMT com diferentes % (m/m) de MMT em comparação ao grau de inchamento das ME de QS (M0N) .....	63
Figura 49- Grau de inchamento em função do tempo das microesferas de QS/argila quimicamente modificada em comparação ao grau de inchamento das ME de QS/MMT produzidas com a mesma % (m/m) de argila (M4N). .....	63
Figura 50-Eficácia de encapsulação das ME de QS, QS/MMT e QS/argilas quimicamente modificadas. ....	65
Figura 51-Perfil de libertação <i>in vitro</i> do AAS, em PBS (pH 7.4), a partir de ME de QS e QS/MMT preparadas com diferentes % (m/m) de MMT. ....	66
Figura 52- Perfil de libertação <i>in vitro</i> do AAS, em SGF (pH 1.2), a partir de ME de QS e QS/MMT preparadas com diferentes % (m/m) de MMT.....	67
Figura 53- Perfil de libertação <i>in vitro</i> do AAS, em PBS (pH 7.4), a partir das ME AASM4N e de ME de QS/argila quimicamente modificada. ....	67
Figura 54- Perfil de libertação <i>in vitro</i> do AAS, em SGF (pH 1.2), a partir das ME AASM4N e de ME de QS/argila quimicamente modificada. ....	68
Figura 55- Absorvância obtida para a amostra M0N em função da concentração equivalente de QS presente no extrato da mesma. ....	71
Figura 56- Absorvância obtida para a amostra M4N em função da concentração equivalente de Nanofil116® presente no extrato da mesma. ....	72
Figura 57- Asorvância obtida para a amostra C10A em função da concentração equivalente de Cloisite10A® presente no extrato da mesma.....	72
Figura 58- Absorvância obtida para as amostras C15A e C20A em função da concentração equivalente de Cloisite15A® e de Cloisite20A®, respetivamente, presente nos extratos das mesmas. ....	73
Figura 59- Absorvância obtida para a amostra C30B em função da concentração equivalente de Cloisite30B® presente no extrato da mesma.....	73
Figura 60- Absorvância obtida para a amostra C93A em função da concentração equivalente de Cloisite93A® presente no extrato da mesma.....	74

Figura 61- Fotografia de Cultura Celular após contato com extrato (concentração equivalente de QS de 100mg/mL) de M0N.....	76
Figura 62- Fotografia de Cultura Celular após contato com extrato (concentração equivalente de Cloisite93A® de 40mg/mL) de C93A.....	76



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos sistemas de libertação controlada de fármacos relativamente aos sistemas tradicionais[7, 8, 10].....	4
Tabela 2- Principais propriedades do quitosano enquanto biomaterial [5, 18, 21-24, 26, 27] ....	9
Tabela 3- Reagentes utilizados na produção dos sistemas de ME.....	21
Tabela 4 - Características das argilas orgânicas utilizadas na produção dos sistemas de ME. As estruturas químicas dos surfatantes foram adaptadas de [65]. ....	22
Tabela 5 - Composição das dispersões de QS/MMT. ....	24
Tabela 6- Composição das dispersões de QS/argila quimicamente modificada. ....	24
Tabela 7- Composição das dispersões de QS/MMT/AAS. ....	25
Tabela 8- Composição das dispersões de QS/argila/AAS.....	25
Tabela 9- Intervalos de tempo em que foram efetuadas medidas do grau de inchamento das ME em PBS/SIF. ....	36
Tabela 10- Intervalos de tempo nos quais foram efetuadas medidas da quantidade de fármaco libertado, mimetizando a toma oral. ....	42
Tabela 11- Intervalos de tempo nos quais foram efetuadas medidas da quantidade de fármaco libertado, tendo em mente um sistema de libertação controlada de fármacos de longa duração implantável (ex: lacunas ósseas). *(a partir deste ponto as amostras foram retiradas diariamente até aos 10 dias).....	42
Tabela 12-Materiais utilizados nos testes de citotoxicidade. ....	43
Tabela 13- Sistemas de ME utilizados nos testes de citotoxicidade. ....	43
Tabela 14- Concentrações equivalentes dos extratos utilizados nos testes de citotoxicidade..	44
Tabela 15- Principais modos de vibração identificados no QS e na amostra MON [2]. ....	48

Tabela 16- Principais modos de vibração identificados no QS, na argila Nanofil116® e na amostra M4N [2, 66]. .....	49
Tabela 17- Principais modos de vibração identificados no QS, nas argilas orgânicas (Cloisite10A®, Cloisite15A®, Cloisite20A®, Cloisite30B® e Cloisite93A®) e nas amostras C10A, C15A, C20A, C30B e C93A [2, 65]. .....	53
Tabela 18-Valores obtidos para o espaçamento basal. ....	56
Tabela 19- Valores do expoente difusional (n) e tipo de libertação de fármaco obtidos para os sistemas de ME produzidos.....	70
Tabela 20- Resultados de citotoxicidade obtidos para as diferentes concentrações equivalentes dos extratos de microesferas testados (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 representam as concentrações totais do extrato de acordo com a Tabela 14). Os resultados são apresentados de acordo com o seguinte código de cores: verde- não citotóxico; amarelo- levemente citotóxico; laranja- moderadamente citotóxico; vermelho- severamente citotóxico. ....	75



## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	33
Equação 2.....	36
Equação 3.....	37
Equação 4.....	40
Equação 5.....	40



## LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

**AAC-** Ácido Acético

**AAS-** Ácido Acetilsalicílico

**AASC10A-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite10A®:AAS (m/m/m) de 3:2:1

**AASC15A-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite15A®:AAS (m/m/m) de 3:2:1

**AASC20A-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite20A®:AAS (m/m/m) de 3:2:1

**AASC30B-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite30B®:AAS (m/m/m) de 3:2:1

**AASC93A-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite93A®:AAS (m/m/m) de 3:2:1

**AASM0N-** Microesferas de razão  
QS:MMT:AAS (m/m/m) de 3:0:1

**AASM1N-** Microesferas de razão  
QS:MMT:AAS (m/m/m) de 6:1:1

**AASM2N-** Microesferas de razão  
QS:MMT:AAS (m/m/m) de 3:1:1

**AASM3N-** Microesferas de razão  
QS:MMT:AAS (m/m/m) de 6:3:1

**AASM4N-** Microesferas de razão  
QS:MMT:AAS (m/m/m) de 3:2:1

**AASM5N** Microesferas de razão  
QS:MMT:AAS (m/m/m) de 6:5:1

**ATR-FTIR-** Espectroscopia de Infravermelho  
por Transformada de Fourier com Reflexão  
Total Atenuada

**C10A-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite10A® (m/m) de 3:2

**C15A-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite15A® (m/m) de 3:2

**C20A-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite20A® (m/m) de 3:2

**C30B-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite30B® (m/m) de 3:2

**C93A-** Microesferas de razão  
QS:Cloisite93A® (m/m) de 3:2

**DRX-** Difração de Raios-X

**EE-** Eficácia de Encapsulação de Fármaco

**M0N-** Microesferas de razão QS:MMT  
(m/m) de 3:0

**M1N-** Microesferas de razão QS:MMT  
(m/m) de 6:1

**M2N-** Microesferas de razão QS:MMT  
(m/m) de 3:1

**M3N-** Microesferas de razão QS:MMT  
(m/m) de 6:3

**M4N-** Microesferas de razão QS:MMT  
(m/m) de 3:2

**M5N-** Microesferas de razão QS:MMT  
(m/m) de 6:5

**ME-** Microesfera(s)

**MEV-**Microscopia Eletrónica de Varrimento

**MMT-** Montemorilonite

**MO-** Microscopia Ótica

**PBS-** Phosphate Buffered Solution

**QS-** Quitosano

**SGF-** Simulated Gastric Fluid

**SIF-** Simulated Intestinal Fluid

**TPF-** Tripolifosfato de Sódio

**UV-VIS-** Espectroscopia de UV- visível

## INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação tem como motivação a crescente necessidade no desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos capazes de ultrapassar as limitações intrínsecas à administração convencional. Desta forma pretende-se produzir sistemas multifuncionais e que permitam uma administração adaptada a um momento, taxa, dose e locais específicos. Os sistemas multifuncionais a desenvolver neste trabalho além de permitirem a libertação de fármaco, são sistemas que pela sua composição permitem promover a multiplicação celular e acelerar o processo de regeneração celular [1].

Neste contexto, a utilização de nanocompósitos de QS/argila tem sido alvo de grande interesse uma vez que, aliando as propriedades da montemorilonite (e.g. propriedades mecânicas, de barreira, entre outras) às propriedades do quitosano (e.g. antibacteriano, anti-hemorrágico, entre outras) se obtêm nanocompósitos híbridos que possuem uma combinação de propriedades bastante atrativa a esta área [2]. Existem diversos estudos acerca do comportamento destes na libertação de fármaco quer seja na forma de filmes, hidrogéis, micro e nanopartículas. Exemplos disso são os estudos de: Dilip Depan *et. al* que reportam a libertação de ibuprofeno a partir de filmes de quitosano/ácido láctico/montemorilonite [3]; Kun-Ho Liu *et. al* que estudaram a libertação de vitamina B12 a partir de nanohidrogéis de quitosano/montemorilonite[4]; Debasish Sahoo *et. al* que promoveram a libertação de Ofloxacina a partir de hidrogéis de quitosano/cloiste30B®[5]. Ghanshyam V. Joshi *et. al* que estudaram a libertação de quinino a partir de microesferas de quitosano/montemorilonite revestidas de Eudragit®[6]; Shuibo Hua *et. al* e Q. Yuan *et. al* que estudaram a libertação de Ofloxacina a partir de micro e nanoesferas de quitosano/montemorilonite, respetivamente [2];

Com este trabalho é, então, pretendido: (i) produzir sistemas de libertação controlada de fármacos com base em nanocompósitos de QS/argila; (ii) estudar a influência da fração mássica de argila utilizada na produção das microesferas no comportamento das mesmas; (iii) e, tendo em consideração a pouca investigação reportada relativamente às argilas quimicamente modificadas, estudar a influencia da utilização das mesmas no comportamento

das microesferas produzidas, comparativamente a microesferas produzidas com a argila natural (montemorilonite).

A presente dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos.

Num primeiro capítulo é feita uma abordagem teórica aos sistemas de libertação controlada de fármacos e às suas mais valias comparativamente à administração convencional. São ainda abordadas as microesferas e os nanocompósitos de quitosano/argila enquanto sistemas de libertação controlada de fármacos. No capítulo dois são apresentados os materiais e métodos utilizados na produção das microesferas de quitosano/argila e no capítulo três são descritas as técnicas utilizadas na caracterização das amostras. De seguida no capítulo quatro são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Por fim, no capítulo cinco apresentam-se as principais conclusões e as perspetivas futuras deste trabalho.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos (SLC)

A administração de uma droga é um processo delicado que exige um compromisso ajustado entre as suas funções terapêuticas e os seus efeitos secundários. Neste contexto, importa salientar que quando um fármaco é administrado num ser humano ou animal, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo, sendo a maioria desperdiçada devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o local de ação[7]. Tal facto, associado também à baixa solubilidade de algumas drogas, leva a que a administração convencional de fármacos (comprimidos, cápsulas ou injeções) exija, frequentemente, a toma de altas e/ou repetidas doses de droga, de modo a garantir que no seu local de ação a mesma se encontra na concentração suficiente para desempenhar as suas funções terapêuticas ao longo de toda a janela temporal necessária. Apesar da eficácia desses tratamentos, a flutuação dos níveis de droga no organismo desde valores próximos do tóxico até níveis sub-terapêuticos é um dos grandes problemas dos sistemas tradicionais de administração de fármacos[8].

Com o intuito de contornar as limitações apresentadas pela administração convencional de fármacos, nas últimas décadas têm-se desenvolvido sistemas de liberação controlada de fármacos (SLC) que têm como objetivo principal o controlo temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármaco para que o benefício clínico da administração deste seja maximizado e os efeitos adversos minimizados. Com o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos pretende-se então (i) controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação de fármaco a partir do sistema num determinado período de tempo, (ii) conduzir o fármaco até ao seu local específico de atuação, superando certas barreiras fisiológicas, tais como o pulmão, a pele e, o intestino, (iii) superar barreiras químicas e metabólicas, como o ambiente no estômago e, (iv) ultrapassar barreiras celulares possibilitando importantes aplicações em terapia genética [7, 9]. Os sistemas tradicionais e os de liberação controlada de fármacos são comparados na Figura 1 e na Tabela 1.

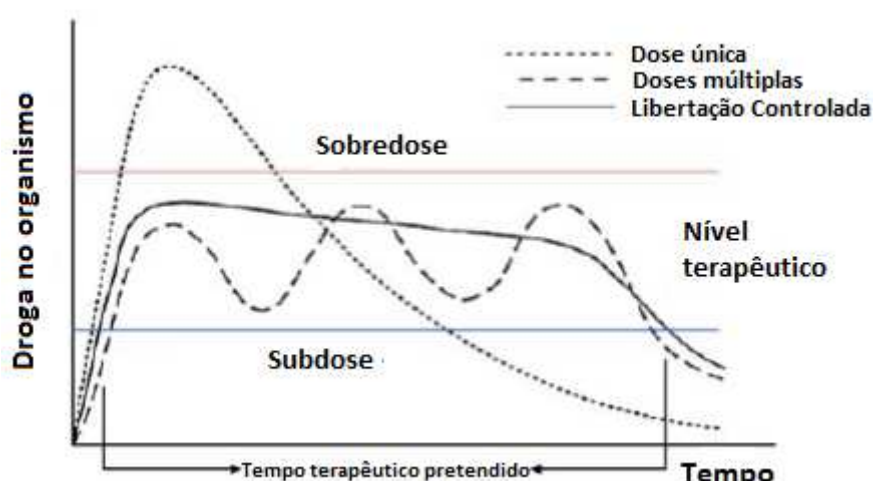


Figura 1- Esquema do efeito da concentração de fármaco no organismo através da utilização de diferentes métodos de administração. Adaptado de [8].

Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos sistemas de liberação controlada de fármacos relativamente aos sistemas tradicionais[7, 8, 10].

Vantagens dos SLC relativamente aos sistemas tradicionais	Desvantagens dos SLC relativamente aos sistemas tradicionais
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extensão da duração da ação e biodisponibilidade do fármaco;</li> <li>• Possibilidade de liberação do princípio ativo adaptada a um momento, taxa, dose e local específicos</li> <li>• Minimização da degradação do fármaco e consequentes perdas do mesmo;</li> <li>• Prevenção de efeitos colaterais adversos da droga;</li> <li>• Redução da frequência de administração;</li> <li>• Minimização das flutuações de concentração de drogas no plasma;</li> <li>• Melhoria no conforto e adesão do paciente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possibilidade de toxicidade dos materiais utilizados e dos seus produtos de degradação (utilização de sistemas biocompatíveis);</li> <li>• Necessidade de intervenção cirúrgica na aplicação ou remoção dos sistemas (não se verifica em sistemas biodegradáveis, como é o caso do presente estudo);</li> <li>• Impossibilidade (usualmente) de ajuste dos regimes posológicos;</li> <li>• Impossibilidade de alteração do tratamento medicamentoso depois de iniciado;</li> <li>• Dificuldades em atingir efeito imediato;</li> <li>• Necessidade de avaliação do <i>burst effect</i> (libertação imediata de uma grande quantidade de fármaco após administração).</li> </ul>



O desenvolvimento de um SLC requer a consideração simultânea de vários fatores, tais como a propriedade da droga, a via de administração, a natureza do veículo de liberação, o mecanismo de liberação de fármaco, a capacidade de segmentação e a biocompatibilidade (Figura 2). Estes fatores possuem uma elevada interdependência que dificulta o desenvolvimento do sistema pois, a escolha de um fator é suscetível de afetar e / ou ser afetado por outros fatores [11].

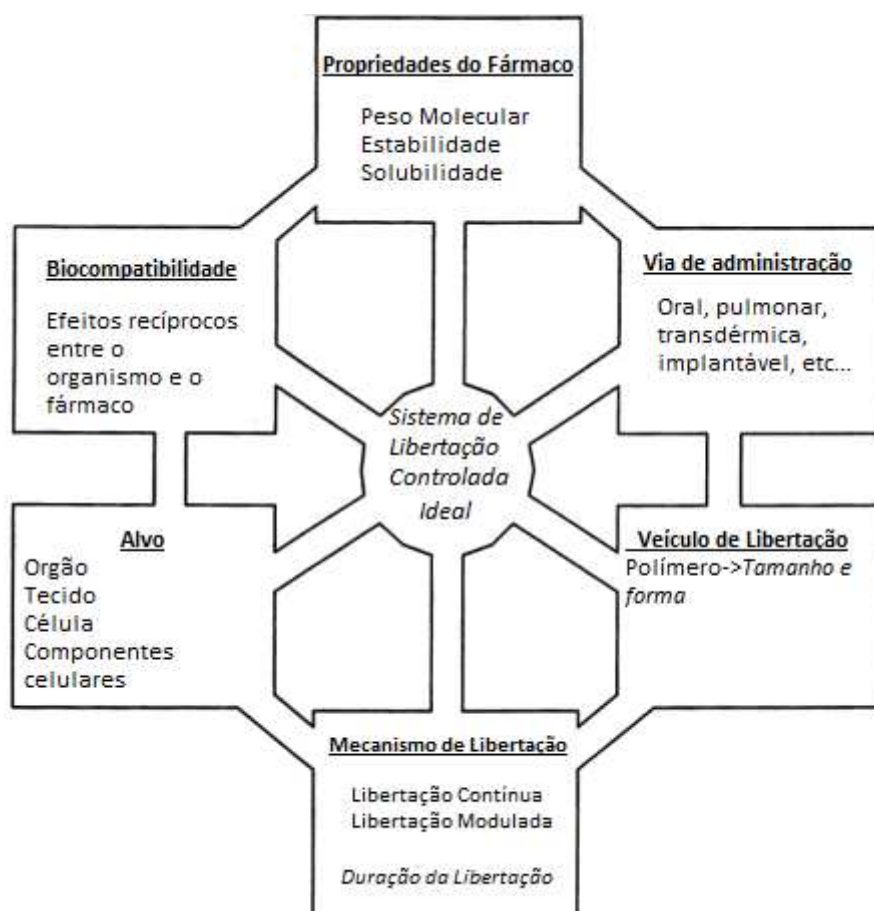


Figura 2- Fatores interdependentes considerados no desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de fármacos[11].

Materiais de natureza lipídica, inorgânica e polimérica têm sido utilizados como suportes de SLC. Destes, os materiais poliméricos são, sem dúvida, os mais investigados [10, 11].

Os SLC podem ser classificados de acordo com vários critérios, incluindo a classe de materiais utilizados (poliméricos ou não poliméricos), o agente terapêutico incorporado (moléculas de baixo peso molecular, proteínas, etc.), o estado físico (líquidos, semi-sólidos ou sólidos), a via

de administração, o mecanismo que controla a liberação de fármaco, entre outros [7, 8, 10, 11].

### 1.1.1. Microesferas em liberação controlada de fármacos

Atualmente, e devido ao crescente interesse nos sistemas de liberação controlada de fármacos, uma grande variedade de dispositivos têm sido utilizados. Neste contexto, as microesferas de base polimérica biodegradável são um dos tipos mais comuns, possuindo inúmeras vantagens relativamente aos restantes [12]. Embora não exista uma definição consensual do que é uma micropartícula, a definição que reúne mais consenso e, que foi adotada neste trabalho, define as micropartículas como partículas que possuem um diâmetro entre 1 $\mu$ m e 1000  $\mu$ m [7, 12-16].

No que se refere às micropartículas, dependendo do processo utilizado na sua preparação, estas podem ser do tipo reservatório (microcápsulas) ou matriz (microesferas) como pode ser observado na Figura 3. A diferença básica entre elas reside na forma de encapsulamento do princípio ativo pelo agente encapsulante, sendo que a combinação entre o material e o agente pode ser de natureza física, química ou físico-química. As microesferas possuem uma estrutura matricial, podendo a substância ativa estar adsorvida na sua superfície, encapsulada ou dissolvida na matriz. Por sua vez, as microcápsulas são micropartículas que possuem um invólucro (agente encapsulante) e um núcleo interior. Neste último caso, i.e. nas microcápsulas, a substância ativa encontra-se geralmente dissolvida no núcleo sob a forma sólida ou líquida, podendo também encontrar-se adsorvida na sua superfície [7, 8, 17].

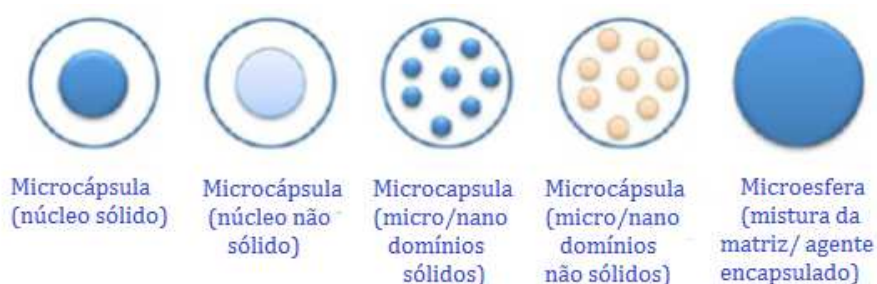


Figura 3- Possíveis morfologias das micropartículas. Adaptado de [16]

As micropartículas podem apresentar diferentes tamanhos, composição e função. Estas características são principalmente influenciadas pelo fim a que se destinam e pelo tipo de substância ativa encapsulada: sólidos, líquidos, fármacos, proteínas, células bacterianas,

células-tronco, entre outros. Desta forma, com o intuito de controlar a liberação de fármaco e maximizar a ação terapêutica, a matriz polimérica, o seu peso molecular, a composição de copolímero e, a natureza de qualquer eventual excipiente adicionado à formulação da microesfera (ex: estabilizante do fármaco) entre outras características são de relevada importância[12, 17, 18].

O uso da terapia baseada em microesferas permite uma liberação do princípio ativo cuidadosamente adaptada a um momento, taxa, dose e local específicos através da escolha e formulação de várias combinações de droga-polímero. Permitindo a encapsulação de compostos normalmente difíceis de administrar, devido a fatores tais como a insolubilidade do material, volatilidade, reatividade, higroscopicidade, e estado físico [10, 17]. A microencapsulação possui ainda diversas outras vantagens nomeadamente a proteção da substância ativa encapsulada, ou seja, evita a sua degradação devido a fatores ambientais externos tais como o oxigénio, luz, calor, humidade e pH. O seu reduzido tamanho e, consequentemente, a sua grande superfície específica é outra vantagem da microencapsulação uma vez que favorece a absorção relativamente a partículas de maiores dimensões, favorecendo a liberação de fármaco por difusão (devido à maior superfície disponível para penetração de água)[10, 18].

No entanto, as micropartículas apresentam algumas limitações. Devido às suas dimensões, estas não podem ser administradas por via intravenosa [12]. Contudo, podem ser administradas por via intramuscular, subcutânea, na forma de implantes, por toma oral, entre outros. Em formulações para a liberação prolongada e localizada (locais de fratura óssea; substituto ósseo, entre outros) são bastante vantajosas, uma vez que permanecem maioritariamente concentradas no local de administração, ao contrário do que acontece com as nanopartículas, que rapidamente entram na corrente sanguínea e se dispersam no organismo. Possuem igualmente elevada importância nas formulações para a toma oral, uma vez que protegem o fármaco da exposição às condições adversas do trato gastrointestinal, nomeadamente o baixo pH. Protegendo também a mucosa do estômago do contacto com o princípio ativo, sendo este libertado apenas no local exato de absorção, o intestino[10, 12]. Um exemplo de toma oral na qual é necessário ter em consideração tais fatores é a toma de ácido acetilsalicílico (utilizado no presente estudo como droga modelo), que pode causar danos na mucosa gástrica caso não seja utilizado um agente encapsulante [19].

### 1.1.2. Nanocompósitos de quitosano e montmorilonite na liberação controlada de fármacos

Nesta secção serão abordados os nanocompósitos de quitosano e montmorilonite enquanto sistemas de liberação controlada de fármacos. Neste contexto será feita uma breve abordagem sobre o quitosano, a montmorilonite e finalmente os nanocompósitos obtidos mediante a intercalação do polímero na argila.

#### 1.1.2.1 Polímeros biodegradáveis

Um polímero é considerado biodegradável quando o mesmo é passível de degradação, quer seja devida à ação ambiental, quer seja com meio a processos biocatalíticos (i.e. processos que envolvem bactérias, fungos, enzimas, etc), ou químicos (i.e. hidrólise, oxidação, radiação UV). Os seus produtos de degradação são metabólitos usualmente presentes no organismo ou outros produtos facilmente metabolizados e eliminados [10, 20].

Entre os polímeros biodegradáveis encontra-se a família dos polissacarídeos da qual faz parte o quitosano. O quitosano é um polissacarídeo catiónico obtido a partir da desacetilação alcalina de outro polissacarídeo, a quitina. A quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, é o principal constituinte do exosqueleto dos crustáceos e insetos, encontrando-se também na parede celular de certos fungos. Ambos os polímeros são constituídos por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranos (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1-4)$  [2, 21-23].

Designa-se por quitosano todos os derivados da quitina obtidos por N-desacetilação da mesma e que apresentem um grau de desacetilação (GD), ou seja, um rácio 2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcN)/2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranos (GlcNAc), superior a 50% [23-25].

A quitina é insolúvel em soluções aquosas e na maioria dos solventes orgânicos convencionais, sendo este o principal fator limitante à sua utilização. O quitosano por sua vez e, apesar de insolúvel em soluções aquosas neutras ou básicas, é solúvel em soluções aquosas ácidas, devido aos grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) livres presentes nas unidades desacetiladas. A pH baixo ( $\text{pH} < 6.5$ ), essas aminas encontram-se protonadas, ou seja, convertidas em grupos  $\text{R}-\text{NH}_3^+$  carregados positivamente (Figura 4) fazem do quitosano um polieletrólito catiónico solúvel em água e, passível de reação com superfícies, polímeros ou drogas aniónicas (como o ácido

acetilsalicílico utilizado no presente estudo). Adicionalmente ao grupo amina, o quitosano possui ainda mais dois grupos reativos, os grupos hidroxilo [18, 22, 24].

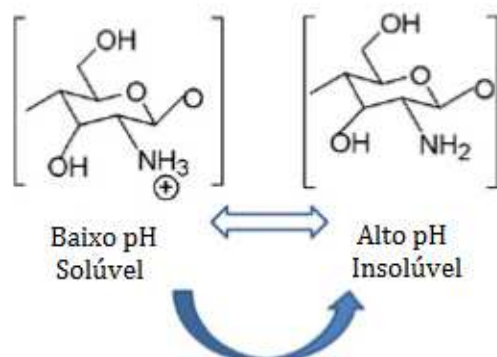


Figura 4- Ilustração esquemática da versatilidade do quitosano. A pH baixo os grupos amina do quitosano estão protonados conferindo-lhe um comportamento policatiónico. Adaptado de [22].

O grande interesse despertado pelo quitosano advém das muitas propriedades atrativas por ele exibidas. Sendo o peso molecular e o grau de desacetilação as duas principais características estruturais responsáveis pelo controle das propriedades químicas, físicas e biológicas do mesmo. Na Tabela 2 encontram-se listadas algumas dessas propriedades.

Tabela 2- Principais propriedades do quitosano enquanto biomaterial [5, 18, 21-24, 26, 27]

### Propriedades do quitosano

- Biodegradabilidade
- Biocompatibilidade
- Bioadesividade/mucoadesividade
- Promotor da absorção, proliferação e diferenciação celular
- Atividade antiinflamatória, antifúngica e antibacteriana
- Promotor da regeneração de vários tecidos (pele, tecido ósseo...)
- Hemoestático
- Anticancerígeno
- Antioxidante
- Capacidade de reticulação, sem utilização de solventes orgânicos (potencialmente perigosos)
- Capacidade de encapsulamento de drogas hidrofílicas e hidrofóbicas

Estas e outras propriedades têm feito do quitosano o polissacarídeo mais utilizado em aplicações biomédicas e farmacêuticas [18, 21-24, 26, 28]. Entre todas as possíveis aplicações, destacam-se os sistemas de liberação controlada de fármacos na forma de géis, hidrogéis, partículas, nano- e micropartículas, filmes, esponjas e comprimidos, administrados por via oral, ocular, nasal, subcutânea e transdérmica [18, 21, 29-31].

### 1.1.2.2 Estrutura e características da montemorilonite

As argilas são comumente definidas como materiais naturais, terrosos, de granulação fina (diâmetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ ), apresentando características plásticas quando humedecidas em água [32, 33].

De entre as diferentes famílias de argila existentes, os filossilicatos, ou silicatos lamelares, que possuem uma estrutura formada por lamelas cristalinas nanométricas bidimensionais empilhadas são os mais estudados. Cada lamela é formada pelo arranjo de dois tipos de folhas cristalinas: (1) folhas tetraédricas compostas por tetraedros de Si–O com cantos compartilhados, e (2) folhas octaédricas compostas por catiões de um metal como o  $\text{Al}^{3+}$  ligados a aniões  $\text{O}^{2-}$  e  $\text{OH}^-$  [33-35].

Quando o catião  $\text{Al}^{3+}$  na camada octaédrica é parcialmente substituído pelo catião  $\text{Mg}^{2+}$ , estamos na presença da montemorilonite (MMT) o filossilicato mais utilizado na preparação de nanocompósitos poliméricos e que, pertence à família dos 2:1 filossilicatos, mais propriamente à família das esmectites [34-36]. A sua estrutura cristalina consiste em lamelas empilhadas, onde uma folha octaédrica central de alumínio se encontra fundida com duas folhas tetraédricas externas de silício, de modo a que os iões de oxigénio da folha octaédrica sejam partilhados com as folhas tetraédricas [34, 37].

A composição química e a fórmula da cela unitária da montmorilonite “teórica” é,  $\text{M}_x(\text{Al}_{4-x}\text{Mg}_x)\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$ , onde  $\text{M}_x$  é um catião monovalente e  $x$  o grau de substituição isomórfica (entre 0.5 e 1.3) [34]. As suas lamelas são empilhadas em paralelo por interações fracas, tais como forças de van der Waals e interações de Coulomb, existindo entre elas uma lacuna de van der Waals, também conhecida como distância interlamelar ou galeria. A galeria é ocupada por catiões, normalmente  $\text{Na}^+$  e/ou  $\text{Ca}^{2+}$ , que vão balancear a carga negativa resultante da substituição isomórfica do  $\text{Al}^{3+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  [3, 34-36, 38]. Na Figura 5 pode observar-se a sua representação estrutural esquemática [34, 39, 40].

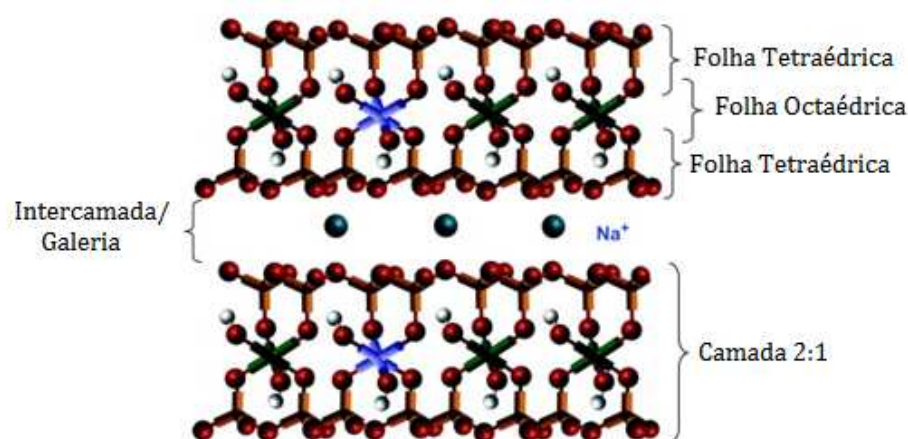


Figura 5- Estrutura da montmorilonite de sódio Adaptado de [40].

A espessura lamelar de cada uma das suas partículas é de aproximadamente um nanómetro, encontrando-se as suas dimensões laterais geralmente entre os 200 e os 600nm. O seu fator de forma (relação comprimento / espessura) é então particularmente elevado, com valores que podem chegar a 1000. A sua distância interlamelar tem em conta as dimensões dos catiões trocáveis intercalados e a presença de água e outras moléculas polares que podem penetrar entre as unidades lamelares, devido às fracas forças que as unem, causando a expansão da estrutura. Quando o sódio está anidro a montmorilonite sódica tem uma lacuna de Van der Waals de cerca de 0,96 nm [34, 35, 40]

O catião  $M_x^+$  que balanceia a carga negativa é chamado de catião trocável, uma vez que literalmente pode ser trocado, de forma reversível, por outros catiões, permitindo desta forma a intercalação de compostos como o quitosano. O teor de catião trocável, expresso em miliequivalentes do catião por 100 g de argila, é chamado CTC – capacidade de troca catiónica. [34, 39, 40] A CTC é uma propriedade importante das argilas, pois pela troca de catiões pode-se modificá-las quimicamente influenciando diretamente as suas propriedades físico-químicas e possíveis aplicações. Os catiões trocáveis podem ser orgânicos ou inorgânicos [34]. A montmorilonite de sódio possui ainda nas suas superfícies grupos terminais hidroxilo passíveis de ligação [41, 42].

Na sua forma natural, a montmorilonite é apenas miscível com polímeros hidrofílicos. Para superar esta limitação, a superfície da argila é modificada através da permuta entre os catiões trocáveis (presentes na galeria) e surfatantes catiónicos orgânicos tais como catiões alquilamónio ou alquifosfónio primários, secundários, terciários ou quaternários (Figura 6). Esta troca iónica tem duas consequências principais: (i) por um lado, a distância interlamelar é

aumentada, permitindo que as cadeias poliméricas se movam entre as lamelas; e (ii) por outro, as propriedades de superfície de cada lamela individual são alteradas passando de hidrófilas para hidrofóbicas. Além disso, os catiões alquilamônio ou alquilfosfônio possuem grupos funcionais passíveis de reagir com a matriz polimérica, ou em alguns casos de iniciar a polimerização de monómeros que, vão melhorar a adesão entre a argila inorgânica e a matriz polimérica. Desta forma, a argila quimicamente modificada, ou argila orgânica, possui uma maior compatibilidade com os polímeros orgânicos no geral, facilitando a intercalação das cadeias poliméricas entre as suas lamelas [34, 35, 40, 43, 44].

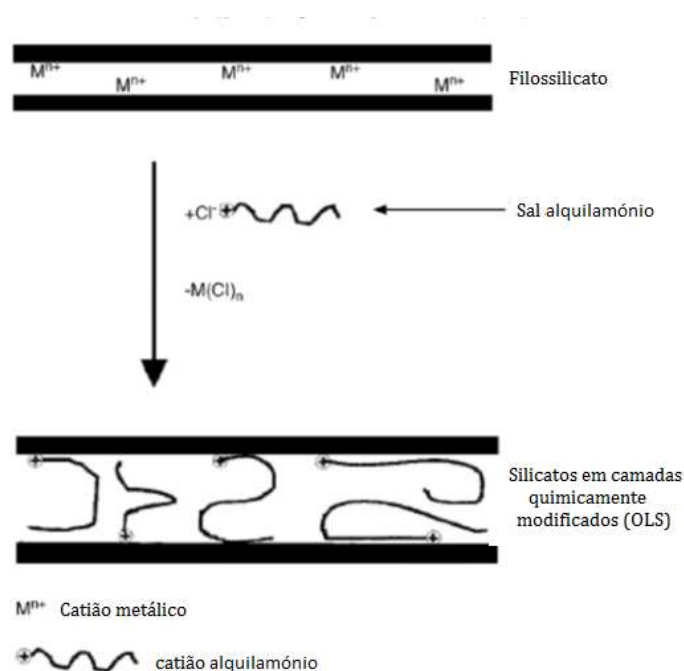


Figura 6- Esquema ilustrativo da modificação química da argila. Adaptado de [35].

No domínio biomédico, os elevados fator de forma e área superficial da montmorilonite conferem-lhe propriedades como boa capacidade de absorção de água e inchamento, capacidade de adsorção, capacidade de troca catiónica, capacidade de transporte e libertação de fármacos, através da intercalação da droga nas suas galerias (principalmente por troca catiónica mas também por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogénio[45]), capacidade mucoadesiva suficiente para ultrapassar a barreira gastrointestinal (GI) e adsorver toxinas bacterianas e metabólicas, tais como metabólitos esteróides, entre outras. Como resultado, esta argila é um ingrediente comum tanto como excipiente como principio ativo em produtos farmacêuticos, sendo chamada por isso de argila médica [1, 2, 46-49].



### 1.1.2.3 Nanocompósitos de quitosano e montmorilonite

Um compósito é um composto multifásico constituído por dois (ou mais) materiais individuais [50]. A grande maioria deles é formada por apenas duas fases: a fase dispersa e a fase contínua, denominada matriz, e que envolve a fase dispersa [34, 36].

No que se refere aos nanocompósitos, estes são uma nova classe de compósitos, na qual pelo menos uma das dimensões das partículas da fase dispersa se encontra na escala manométrica [34].

Entre todos os potenciais precursores de nanocompósitos, aqueles baseados em argilas filossilicatadas, como a montmorilonite, têm sido amplamente investigados. Duas das características particulares dos filossilicatos são geralmente consideradas: (i) a capacidade das partículas de filossilicato de dispersarem em camadas individuais, permitindo a intercalação ou exfoliação do polímero; e (ii) a capacidade de modificar quimicamente a superfície da argila por meio de reações de troca iónica com catiões orgânicos e inorgânicos. Estas duas características estão, naturalmente, interligadas uma vez que o grau de dispersão do filossilicato na matriz polimérica depende do catião trocável [44].

Quando comparados a compósitos convencionais ou ao polímero puro, os nanocompósitos de polímero/filossilicatos apresentam melhorias significativas no que se refere às suas propriedades óticas, físicas, reológicas, mecânicas e de barreira. Atendendo a que estas melhorias podem ser conseguidas pela adição de uma pequena fração de argila a uma matriz polimérica (a fração em peso do aditivo inorgânico é tipicamente inferior a 10%), os materiais nanocompósitos são mais leves do que os compósitos mais convencionais [34, 36, 43]. A principal razão para esta melhoria das propriedades dos nanocompósitos de polímero-filossilicatos é o facto de a argila apresentar uma área de superfície extraordinariamente elevada, o que permite a ocorrência de fortes interações entre esta e a matriz (muito mais fortes do que as que se encontram em compósitos convencionais) [44].

Estas propriedades únicas, aliadas ao baixo custo e grande disponibilidade da montmorilonite tornam os nanocompósitos de polímero-montmorilonite ideais para várias aplicações biomédicas (Figura 7). De entre as possíveis aplicações biomédicas destes materiais, destaca-se a libertação controlada de fármacos [34], que depende de vários fatores tais como a cinética de libertação, a proporção e grau de dispersão das nanopartículas de filossilicato, a CTC da argila, a droga utilizada e o pH do meio em que ocorre a libertação [51].



Figura 7- Possíveis aplicações biomédicas dos nanocompósitos de polímero-filossilicatos. Adaptado de [52]

Especificamente, os nanocompósitos de quitosano/montemorilonite têm recentemente despertado grande interesse no ambiente biomédico, uma vez que estes aliando as propriedades do filossilicato (e.g. propriedades mecânicas, de barreira, entre outras) às propriedades do quitosano (e.g. antibacteriano, anti-hemorrágico, entre outras) obtêm-se nanocompósitos híbridos que exibem uma combinação de propriedades bastante atrativa. Neste contexto, e sendo o quitosano um polímero hidrofílico e catiónico, a sua intercalação nas galerias da montemorilonite sódica está favorecida. A interação entre o quitosano e a argila dá-se por um mecanismo de troca catiónica que envolve a interação entre o grupo amina protonado do quitosano ( $\text{NH}_3^+$ ) e locais carregados negativamente na estrutura da argila (Figura 8). Esta interação influencia, principalmente, a capacidade de adsorção do nanocompósito, gerando uma estrutura reticulada forte, com uma capacidade de troca aniônica maior [2].

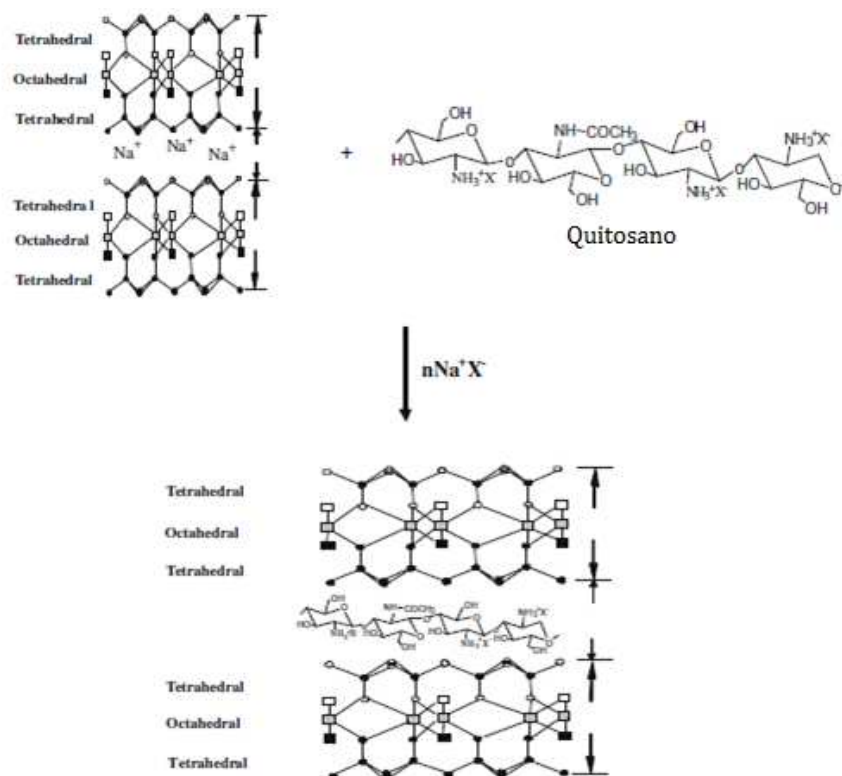


Figura 8- Esquema ilustrativo da intercalação do quitosano na distância interlamelar da montemorilonite. Adaptado de [2].

Enquanto sistema de liberação controlada de fármacos, os nanocompósitos de quitosano-montemorilonite, têm sido extensamente estudados [2-6, 49, 53-56], e apresentam inúmeras vantagens [57, 58]:

- (i) A intercalação do quitosano catiónico nas galerias da montemorilonite sódica neutraliza a forte ligação entre drogas catiónicas e a argila aniônica, facilitando a liberação da droga;
- (ii) A solubilidade do quitosano no baixo pH do fluido gástrico diminui, minimizando a liberação prematura de fármaco no ambiente gástrico. A reduzida solubilidade dos nanocompósitos de quitosano/argila em pH gástrico proporciona vantagens significativas para o desenvolvimento de SLC no colon, visto que algumas drogas são destruídas no estômago, a pH ácido e na presença das enzimas digestivas. Além disso, as propriedades mucoadesivas do quitosano e da argila aumentam a biodisponibilidade dos fármacos no trato gastrointestinal;
- (iii) O quitosano sendo catiónico, possibilita o encapsulamento de drogas carregadas negativamente;

- (iv) A presença dos grupos amina reativos no quitosano proporciona pontes de ligação específicas para uma libertação direcionada a um alvo;
- (v) A presença da argila melhora as propriedades mecânicas, de barreira entre outras do quitosano;
- (vi) O sistema resultante é biodegradável o que é particularmente atraente para aplicação em SLC uma vez que, uma vez introduzidos no organismo, não exigem a remoção cirúrgica ou manipulação adicional;
- (vii) A presença da argila diminui a taxa de degradação do sistema e consequentemente a taxa de libertação de fármaco, tornando-se este um ótimo candidato para sistemas de libertação controlada de fármacos implantáveis, tais como dispositivos de regeneração óssea ou de preenchimento de lacunas ósseas.

## Tipos de nanocompósitos

Dependendo da natureza dos componentes utilizados (filossilicato, catião orgânico e matriz de polimérica) e do método de preparação, podem obter-se três tipos principais de compósitos (Figura 9): (i) **Compósitos reforçados por micropartículas (aglomerados de nanoargilas)**, cujas propriedades estão na mesma gama das propriedades dos compósitos tradicionais, são obtidos quando o polímero é incapaz de intercalar nas galerias do filossilicato. A aglomeração das partículas tende a reduzir a resistência obtendo-se assim materiais mais fracos. Desta forma, comprova-se que a mistura física entre um polímero e um filossilicato, não forma necessariamente um nanocompósito [34, 36]. (ii) **Nanocompósitos intercalados**, nos quais uma cadeia de polímero (por vezes mais de uma) é intercalada entre as lamelas do filossilicato resultando numa morfologia de camadas múltiplas bem ordenadas na qual, camadas poliméricas alternam com camadas inorgânicas. As propriedades deste tipo de nanocompósitos assemelham-se às dos materiais cerâmicos [35, 36]. (iii) **Nanocompósitos esfoliados ou delaminados**, onde as lamelas individuais de argila estão separadas e uniformemente dispersas numa matriz polimérica, maximizando assim as interações polímero-argila e melhorando as propriedades mecânicas quando comparadas com nanocompósitos intercalados [34-36, 43].

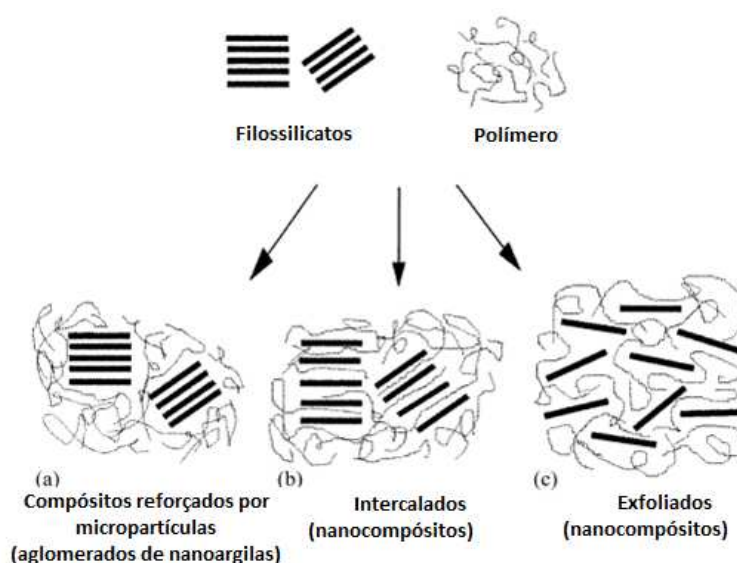


Figura 9- Esquema dos diferentes tipos de compósitos resultantes da interação entre filossilicatos e polímeros: (a) compostos reforçados por micropartículas (aglomerados de nanoargilas), (b) nanocompósito intercalado e (c) nanocompósito esfoliado. Adaptado de [36].

### 1.1.3. Mecanismos de liberação de fármaco em SLC de base polimérica biodegradável

Polímeros biodegradáveis e bioerodíveis representam uma importante classe de materiais utilizados em SLC. A distinção entre estes dois conceitos é baseada na forma de ocorrência da degradação, sendo que em esferas à base de quitosano ambos se verificam.

O termo degradação é aplicado quando o peso molecular do polímero diminui devido a reações químicas que provocam a cisão das cadeias (Figura 10) e, a obtenção de oligómeros mais curtos, monómeros e outros produtos de degradação de peso molecular mais baixo [8, 10]. Na liberação controlada, os polímeros biodegradáveis são tipicamente degradados por hidrólise e/ou por ação enzimática. A degradação hidrolítica está intimamente ligada à capacidade de absorção de água do polímero, como tal, matrizes hidrofílicas são suscetíveis de uma degradação mais rápida que matrizes hidrofóbicas [10].

Por sua vez, a erosão é definida como a desintegração física da matriz polimérica como resultado da degradação, através da difusão e dissolução dos materiais resultantes da mesma e, implica uma perda de massa por parte do sistema [8, 10]. A erosão pode ser classificada como superficial ou volumica (Figura 11). Na erosão superficial a matriz polimérica é progressivamente removida à superfície, mas a fração volumica do polímero permanece

relativamente inalterada. Nestes casos, a penetração de água na matriz polimérica é mais lenta que a erosão da mesma. Contrariamente, caso a penetração de água seja mais rápida que a erosão da matriz polimérica a degradação ocorrerá em toda a matriz, estando-se na presença de erosão volúmica. Na erosão volúmica não ocorre uma mudança significativa no tamanho físico do sistema polimérico até que este fique quase totalmente degradado/erodido (momento em que se dá o colapso do sistema) contudo, a fração volúmica de polímero na matriz diminui ao longo do tempo [8, 10, 59].

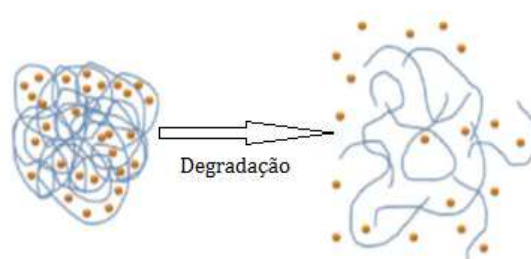


Figura 10- Esquema ilustrativo da degradação das cadeias poliméricas, com consequente libertação de fármaco. Adaptado de [8].

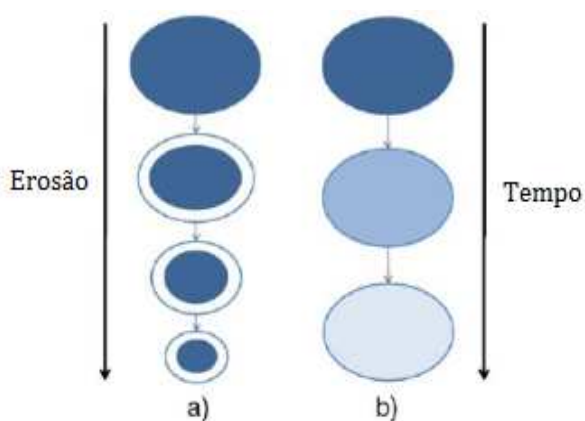


Figura 11- Esquema representativo da erosão (a) superficial, e (b) volúmica. Adaptado de [8].

A libertação de fármacos a partir de uma matriz polimérica biodegradável ocorre então, devido a três mecanismos principais: **(i)** erosão polimérica; **(ii)** difusão através da matriz e; **(iii)** dissolução da droga no meio circundante (Figura 12) [10, 14].

A dissolução da droga no meio circundante é mais significativa nos estágios iniciais de incubação, quando as moléculas de droga depositada sobre ou perto da superfície da matriz são libertadas [10]. Nesta fase inicial, dá-se uma abrupta libertação do fármaco encapsulado, conhecida como *burst effect*. Esta pode ser impedida ou minimizada com o aumento da

densidade de reticulação das cadeias poliméricas [60]. Numa segunda fase, as moléculas de fármaco encapsuladas na matriz de base polimérica biodegradável são libertadas conforme o material degradado é libertado da matriz polimérica por erosão. Sendo o gradiente de concentração a força motriz para a difusão das moléculas de droga desde a matriz polimérica até ao meio circundante [10].

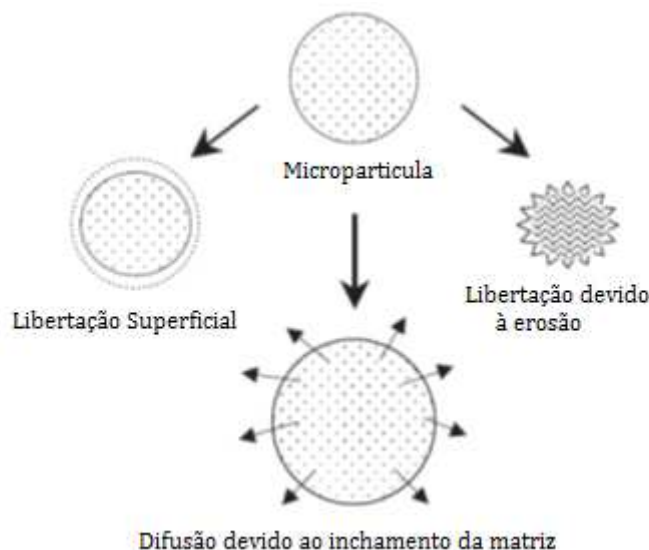


Figura 12- Mecanismos de libertação de fármaco em microesferas de base biodegradável polimérica. Adaptado de [60].

Para a grande maioria dos sistemas de libertação de fármacos todos os mecanismos contribuem para a libertação da droga, mas em proporções diferentes. A importância relativa dos três mecanismos na taxa de libertação global varia então de acordo com propriedades como a hidrofilia do polímero, o grau de reticulação das cadeias poliméricas, a velocidade de degradação do polímero, o seu peso molecular, a densidade, o tamanho, a forma e a porosidade da matriz e, as propriedades físico-químicas da droga (peso molecular e solubilidade em água). Dependendo ainda do pH, da temperatura e da presença de enzimas nos meios de dissolução [10, 60].

## 1.2. Fármaco Modelo

O ácido acetilsalicílico (AAS), comumente conhecido como Aspirina<sup>®</sup>, é uma droga pouco solúvel em água, derivada do ácido salicílico [61]. E que sofre hidrólise em ambiente aquoso, principalmente em ambiente básico, de acordo com a Figura 13 [62].

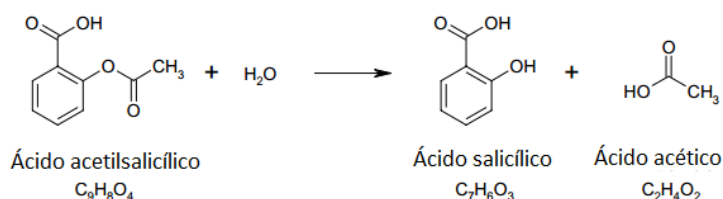


Figura 13- Mecanismo de hidrólise do ácido acetilsalicílico.

A Aspirina® é um fármaco do grupo dos anti-inflamatórios não-esteroides e antipiréticos amplamente utilizado no alívio da dor [63]. É ainda um importante antiplaquetário utilizado na prevenção de eventos cardiovasculares, tais como o enfarte do miocárdio e a oclusão vascular na circulação cerebral e periférica [61, 64]. Contudo, a Aspirina® é também conhecida por ser prejudicial à mucosa gástrica, aumentando a incidência de lesões da mucosa (i.e. erosão, úlceras ou ambos) ou até mesmo hemorragias gástricas [64].

A administração da aspirina® baseia-se principalmente na dosagem oral e normalmente requer o uso diário durante longos períodos de tempo. Ensaios clínicos sugerem então, que a liberação controlada de Aspirina® iria aumentar a eficácia terapêutica da droga e proteger a mucosa gástrica da ação da mesma. Desta forma, a Aspirina® torna-se um ótimo candidato a fármaco modelo num SLC e, sendo por isso o escolhido neste trabalho experimental [64].



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

### 2.1. Materiais

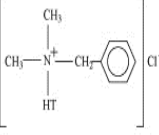
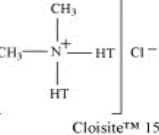
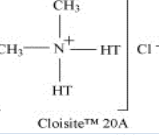
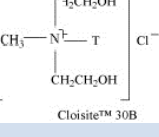
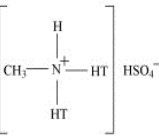
Na produção das ME utilizaram-se, como reagentes, ácido acético (AAC), quitosano (QS), ácido acetilsalicílico (AAS) e tripolifosfato de sódio (TPF). Na Tabela 3 encontram-se as principais especificações e fornecedores dos referidos reagentes.

Tabela 3- Reagentes utilizados na produção dos sistemas de ME.

Reagentes	Especificações	Fornecedor
<b>Ácido acético (AAC) -</b> <b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	99,7% M=60,05 g/mol	Panreac
<b>Quitosano (QS) -</b> <b>C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub></b>	Elevado peso molecular	Siveele
<b>Ácido acetilsalicílico</b> <b>(AAS) - C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub></b>	≥99.0% cristalino M=180,16 g/mol	Sigma Aldrich
<b>TPF- Na<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P<sub>3</sub></b>	M=367,86 g/mol	Sigma Aldrich

Foram ainda utilizadas, tal como recebidas, argilas da Southern argila, Inc. Especificamente, montmorilonite sódica (Nanofil116<sup>®</sup>/Na<sup>+</sup>-MMT, no decorrer do trabalho será referida como MMT ou Nanofil116<sup>®</sup>) e montmorilonites organicamente modificadas (argilas orgânicas), entre as quais a Cloisite10A<sup>®</sup>, Cloisite15A<sup>®</sup>, Cloisite20A<sup>®</sup>, Cloisite30B<sup>®</sup> e Cloisite93A<sup>®</sup>. As estruturas químicas dos modificadores orgânicos (surfatantes) bem como as características das argilas orgânicas encontram-se na Tabela 4, respetivamente.

Tabela 4 - Características das argilas orgânicas utilizadas na produção dos sistemas de ME. As estruturas químicas dos surfatantes foram adaptadas de [65].

Argila	Modificador orgânico (surfatante)	Estrutura química do surfatante	Concentração de modificador (meq/100g argila)	Anião
Nanofil116®	Nenhum	-	-	Nenhum
Cloisite10A®	dimethyl, benzyl, hydrogenatedtallow, quaternary ammonium (2MBHT)		125	Cloreto (Cl <sup>-</sup> )
Cloisite15A®	dimethyl, dihydrogenatedtallow, quaternary ammonium (2M2HT)		125	Cloreto (Cl <sup>-</sup> )
Cloisite20®	dimethyl, dihydrogenatedtallow, quaternary ammonium (2M2HT)		95	Cloreto (Cl <sup>-</sup> )
Cloisite30B®	methyl, tallow, bis-2-hydroxyethyl, quaternary ammonium (MT2EtOH)		90	Cloreto (Cl <sup>-</sup> )
Cloisite93A®	methyl, dihydrogenatedtallow ammonium (M2HT)		95	Bissulfato (HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )

## 2.2. Métodos Experimentais

### 2.2.1. Preparação das dispersões precursoras das microesferas

#### Método utilizado na preparação dos nanocompósitos de quitosano/argila

Um método comumente utilizado para a preparação de nanocompósitos polímero-filossilicatos baseia-se na intercalação do polímero nos espaços interlamelares do filossilicato. Esta intercalação das cadeias de polímero nas galerias do filossilicato pode ser conseguida por diversas técnicas. No presente trabalho, devido à simplicidade e baixo custo do método, a

técnica utilizada foi a **intercalação em solução** (Figura 14). A intercalação de um polímero a partir de uma solução é um processo que envolve duas fases [34, 36, 43]:

- Numa primeira fase as camadas do filossilicato são expandidas/ intercaladas por um solvente adequado à solubilidade do polímero e ao inchamento da argila (no presente estudo, solução aquosa de ácido acético a 2% (m/m)).
- Numa segunda fase, quando o polímero é adicionado à dispersão de argila, as cadeias poliméricas substituem o solvente previamente intercalado nas galerias do filossilicato, ficando estas intercaladas. Tal substituição requer uma variação negativa na energia livre de Gibbs. A força motriz para a intercalação do polímero na dispersão de filossilicatos é a entropia ganha por dessorção das moléculas de solvente e, que compensa a diminuição da entropia nas cadeias poliméricas intercaladas.

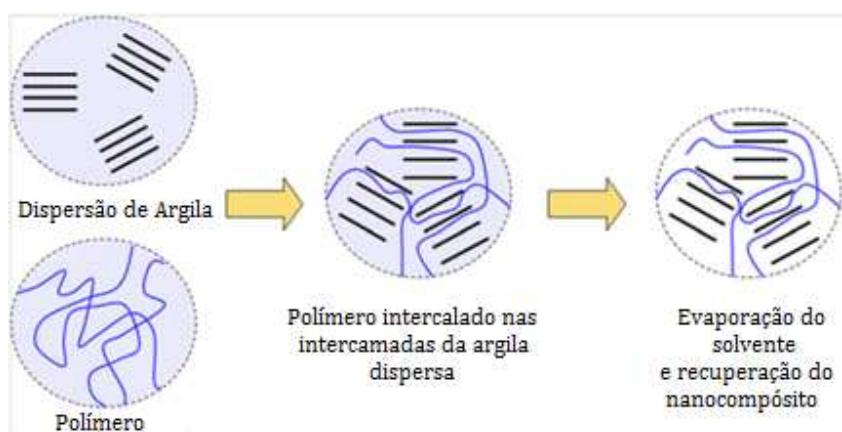


Figura 14- Esquema representativo da obtenção de nanocompósitos pelo método de intercalação em solução. Adaptado de [34].

#### 2.2.1.1 Preparação das dispersões de quitosano e argila, precursoras das ME

As concentrações de argila e de QS utilizadas nesta etapa experimental foram adaptadas de Shuibo Hua *et. al* [66].

De acordo com a técnica descrita em 2.2.1 foram preparados dois sistemas de dispersões. No primeiro sistema e com o intuito de verificar a influência da concentração de argila nas propriedades das microesferas preparam-se dispersões com diferentes concentrações de Nanofil116® (Tabela 5). No segundo sistema e com o intuito de estudar a influência das diferentes argilas prepararam-se dispersões com a mesma massa de argila mas diferentes argilas (Tabela 6). Para ambos os sistemas: **(i)** dispersaram-se, separadamente, as argilas em

100mL de solução de AAC a 2%(m/v) permanecendo, estas dispersões, sob agitação magnética à temperatura ambiente por um período de 1 hora. **(ii)** Posteriormente dissolveram-se 3g de QS em cada dispersão de argila, colocando-se estas dispersões sob agitação magnética, novamente durante aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente. **(iii)** Por fim, e tendo em conta que um dos aspetos relevantes na obtenção de nanocompósitos é promover a dispersão da argila na matriz polimérica, sonicaram-se (ciclo=1 e Amplitude=100%) as dispersões durante 15 minutos num sonicador de haste (*UP400S Ultrasonic Processor*).

Tabela 5 - Composição das dispersões de QS/MMT.

Nome da Amostra	QS (g/100mL)	MMT (g/100mL)	Razão QS:MMT (m/m)
M0N	3	0	3:0
M1N	3	0,5	6:1
M2N	3	1	3:1
M3N	3	1,5	6:3
M4N	3	2	3:2
M5N	3	2,5	6:5

Tabela 6- Composição das dispersões de QS/argila quimicamente modificada.

Argila	Nome da Amostra	QS (g/100mL)	Argila (g/100mL)	Razão QS:Argila (m/m)
Cloisite10A®	C10A	3	2	3:2
Cloisite15A®	C15A	3	2	3:2
Cloisite20A®	C20A	3	2	3:2
Cloisite30B®	C30B	3	2	3:2
Cloisite93A®	C93A	3	2	3:2

### 2.2.1.2 Preparação das dispersões de quitosano/argila/ácido acetilsalicílico precursoras das microesferas

As concentrações de argila, QS e AAS utilizadas nesta etapa experimental foram adaptadas de Shuibo Hua *et. al* [66].

À semelhança do descrito no ponto 2.2.1.1, prepararam-se dois sistemas de dispersões (Tabela 7 e Tabela 8), mediante: **(i)** dissolução de 2g da argila em questão em 100mL de AAC a 2% (m/v) seguida de 1 hora de agitação magnética à temperatura ambiente. **(ii)** A estas dispersões acrescentou-se 1g de AAS, tendo estas sido novamente sujeitas a 1 hora de agitação magnética à temperatura ambiente. **(iii)** Dissolveram-se 3g de QS em cada uma das dispersões de argila, seguindo-se 1 hora de agitação magnética à temperatura ambiente. **(iv)** Por fim, sonicaram-se (ciclo=1 e Amplitude=100%) as dispersões durante 15 min (*UP400S Ultrasonic Processor*).

Tabela 7- Composição das dispersões de QS/MMT/AAS.

Nome da Amostra	QS (g/100mL)	MMT (g/100mL)	AAS (g/100ml)	Razão QS:MMT:AAS (m/m/m)
AASM0N	3	0	1	3:0:1
AASM1N	3	0,5	1	6:1:1
AASM2N	3	1	1	3:1:1
AASM3N	3	1,5	1	6:3:1
AASM4N	3	2	1	3:2:1
AASM5N	3	2,5	1	6:5:1

Tabela 8- Composição das dispersões de QS/argila/AAS.

Argila	Nome da Amostra	QS (g/100mL)	Argila (g/100mL)	AAS (g/100mL)	Razão QS:Argila:AAS (m/m/m)
Nanofil116®	AASM4N	3	2	1	3:2:1
Cloisite10®	AASC10A	3	2	1	3:2:1
Cloisite15A®	AASC15A	3	2	1	3:2:1
Cloisite20A®	AASC20A	3	2	1	3:2:1
Cloisite30B®	AASC30B	3	2	1	3:2:1
Cloisite93A®	AASC93A	3	2	1	3:2:1

## 2.2.2. Produção das microesferas

### Método utilizado na produção dos sistemas de ME

De entre todos os processos possíveis para a preparação de microesferas (emulsão, microfluídica, entre outros), o escolhido neste estudo foi a **reticulação iónica**, principalmente por ser um processo simples.

A reticulação física ou iónica do quitosano consiste na interação electrostática entre um poli-anião, como o Tripolifosfato de Sódio (TPF), e um catião, o quitosano. Neste método o quitosano é dissolvido numa solução aquosa ácida (ácido acético 2% (m/v)), desta forma os grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) são protonados, sendo convertidos em grupos  $\text{R-NH}^{3+}$  carregados positivamente que vão interagir com o TPF (Figura 15) [60].

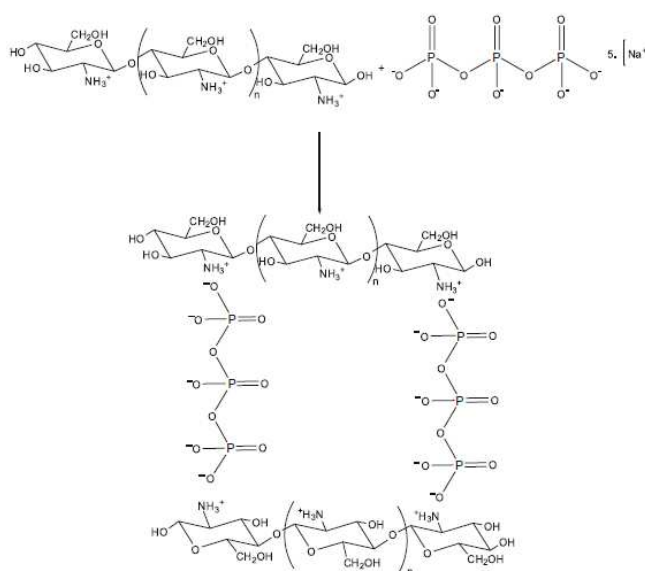


Figura 15-Esquema representativo da interação entre o quitosano e o tripolifosfato de sódio [8].

Este é um processo muito promissor em aplicações biomédicas, uma vez que a reticulação é reversível e pode, em grande parte evitar a possível toxicidade ou outros efeitos adversos dos reagentes [8, 60].

O pH da solução de TPF e a concentração da mesma vão influenciar a eficácia de encapsulamento e libertação de fármacos em microesferas reticuladas ionicamente pois, vão também influenciar as interações entre o tripolifosfato de sódio e o quitosano e desta forma a capacidade de reticulação [67]. Wan Ajun *et. al* concluíram que, o pH ótimo para a produção

de microesferas pode ser: (i) pH muito baixo (pH 3), uma vez que na solução de TPF existem aniões  $P_3O_{10}^{5-}$  que vão interagir com os grupos amino protonados do quitosano; ou (ii) pH alto (pH 8.6), uma vez que o TPF é dissociado em  $OH^-$  e iões  $HP_3O_{10}^{4-}$  e  $P_3O_{10}^{5-}$  que vão interagir com o grupo amina do quitosano contudo, em pH elevado, a ionização do grupo amina diminui. Concluíram ainda que o aumento da concentração de TPF melhora a capacidade de reticulação. Quanto maior for a concentração de TPF maior será a quantidade de iões deste disponíveis para interagir e reticular o quitosano. No presente trabalho utilizou-se uma solução de TPF de pH=8.6 (pH original do TPF) e %(m/m) de 10 [68].

### Procedimento Experimental

A montagem experimental utilizada na produção dos sistemas de ME encontra-se na Figura 16.

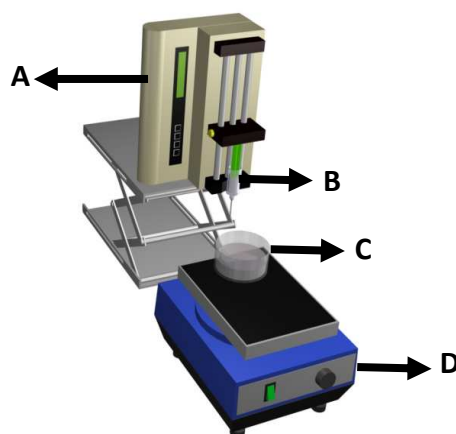


Figura 16- Montagem experimental utilizada na produção das ME. Onde: A- Bomba infusora (KD SCIENTIFIC 100); B- Seringa (B.BRAUN Injekt de 10mL de volume) e agulha (G25); C- Tina; D- Agitador orbital (IKA-VIBRAMAX-VRX).

De acordo com a técnica descrita anteriormente realizaram-se os seguintes passos: **(i)** A fase dispersa foi introduzida numa seringa de 10 mL, **(ii)** posteriormente colocada na bomba infusora com um caudal de 10mL/h. Este caudal promoveu a queda gota a gota da dispersão na solução de TPF que se encontrava em constante agitação orbital (50 rpm), ocorrendo assim a reticulação das ME. **(iii)** Para a obtenção de um número considerável de ME, este processo foi repetido, em média, 5 vezes. **(iv)** As ME formadas permaneceram na solução reticulante durante 30 minutos após os quais **(v)** foram filtradas com uma malha de aço (300 $\mu$ m); e **(vi)** lavadas 3 vezes com água millipore. **(vii)** O processo de secagem das ME consistiu em 24 horas à temperatura ambiente e, posteriormente a 6 horas numa estufa (MEMMERT) a 70°C.

Este procedimento foi repetido para todas as dispersões descritas nos pontos 2.2.1.1 e 2.2.1.2, tendo-se preparado as seguintes amostras de ME: M0N, M1N, M2N, M3N, M4N, M5N, C10A, C15A, C20A, C30B, C93A, AASM0N, AASM1N, AASM2N, AASM3N, AASM4N, AASM5N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B E AASC93A.

### 2.2.3. Liofilização das microesferas reticuladas ionicamente

A liofilização é uma técnica na qual a água ou outro solvente é removido no estado congelado, e convertido diretamente em vapor, ou seja, onde ocorre a sublimação do solvente. Este processo envolve a absorção de calor por parte da amostra previamente congelada (com recurso a azoto líquido) por forma a vaporizar o gelo. Para tal, utiliza-se uma bomba vácuo que vai aumentar a remoção do vapor de água da superfície da amostra, devendo o condensador (que vai remover o solvente vaporizado a partir da câmara de vácuo através da conversão deste de volta ao estado sólido) encontrar-se mais frio que a superfície do material, caso contrário, o vapor de água não migrará para lá.

As amostras liofilizadas apresentam poros microscópicos criados pelos cristais de gelo sublimados [69].

#### **Procedimento experimental**

Liofilizaram-se todas as ME (produzidas em 2.2.2.) depois de reticuladas ionicamente com o intuito de obter esferas mais frágeis e passíveis de serem transformadas em pó, com recurso a um almofariz. Esse pó foi posteriormente utilizado na caracterização das amostras, como veremos no capítulo das Técnicas de Caracterização (3.1.1 e 3.1.2). Neste contexto, as amostras foram previamente congeladas com azoto líquido e colocadas no liofilizador (*VaCo 2, Zirbus technology*-Figura 17), durante ciclos de 24h à temperatura de  $-54,1^{\circ}\text{C}$  e à pressão de 0,042mbar.





Figura 17- Liofilizador VaCo 2, Zirbus technology.



### 3. TÉCNICAS DE CARATERIZAÇÃO

#### 3.1. Caraterização Físico-Química e Estrutural

As ME produzidas foram caracterizadas físico-química e estruturalmente através de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR) e difração de raios-x (DRX).

##### 3.1.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR- FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) consiste na recolha de um espectro de absorção ou transmissão resultante da aplicação de um feixe de radiação infravermelha na amostra em estudo. O feixe de radiação infravermelha é conduzido através de um dispositivo ótico chamado interferómetro e, ao atravessar a amostra é medido sobre a forma de interferograma. O interferograma, um tipo único de sinal que possui informações sobre cada frequência infravermelha vinda da fonte, é posteriormente convertido em números de onda através da aplicação de uma transformada de Fourier (Figura 18).

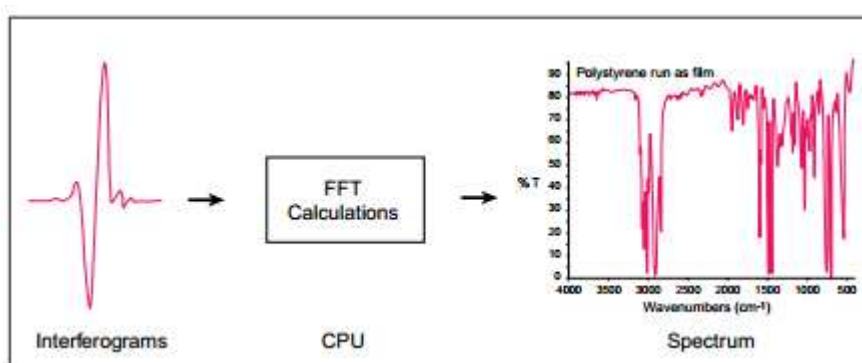


Figura 18- Esquema elucidativo da aplicação da transformada de Fourier [70].

Um espectro de infravermelho representa uma impressão digital de uma amostra com picos de absorção correspondentes às frequências de vibração entre as ligações dos átomos que constituem o material. Sendo que cada material é uma combinação única de átomos, não há dois compostos capazes de produzir o mesmo espectro de infravermelho. O FTIR resulta então numa análise qualitativa dos grupos funcionais de cada tipo de material. Além disso, o tamanho dos picos do espectro é uma indicação direta da quantidade de material presente na amostra [70].

### **Procedimento Experimental**

No presente estudo pretendia-se identificar os grupos funcionais presentes nas ME. Para tal, as ME sem adição de princípio ativo foram reduzidas a pó (como foi descrito em 2.2.3), que posteriormente foi analisado utilizando-se o espectrómetro *Thermo Scientific Nicolet 6700* com reflexão total atenuada (ATR), no intervalo espectral de  $4000\text{cm}^{-1}$  a  $400\text{cm}^{-1}$ . O ATR é uma das técnicas de FTIR mais utilizadas, na qual as partículas, quer a seco quer em solução, são depositadas sobre um cristal horizontal, neste caso, um diamante, para análise. A radiação é refletida através do cristal penetrando na amostra, com um poder de penetração de alguns micrómetros e, depois refletida de volta para um detetor [71]. Foram analisadas, através deste método, todas as ME produzidas sem fármaco.

### **3.1.2. Difração de Raios X (DRX)**

Quanto à sua estrutura interna, um material pode ser cristalino (i.e. apresenta um arranjo periódico dos seus constituintes) ou amorfo (i.e. apresenta um arranjo aleatório dos seus constituintes), sendo a informação sobre a estrutura cristalina do material fornecida pela técnica de DRX.

Neste trabalho a difração de Raios-X foi realizada para avaliar a intercalação/exfoliação do quitosano e do AAS nas galerias da argila. Observando a posição, forma e intensidade das reflexões basais (picos de difração) do filossilicato, é possível identificar a estrutura do compósito. De acordo com o tipo de compósito podem observar-se três situações (Figura 19): **(i)** Para compósitos reforçados com micropartículas, a estrutura do filossilicato não é afetada, desta forma, as características das reflexões basais também não o são. **(ii)** Em nanocompósitos intercalados, a intercalação das cadeias poliméricas aumenta o espaço entre as lamelas, o que conduz a um deslocamento do pico de difração para menores ângulos em comparação à argila

pura. (iii) Por sua vez, em nanocompósitos de estrutura esfoliada deixam de ser visíveis picos de difração nos difratogramas de DRX, devido a um espaçamento muito grande entre as lamelas (superior a 8 nm, no caso da estrutura ordenada esfoliada) [34, 36].

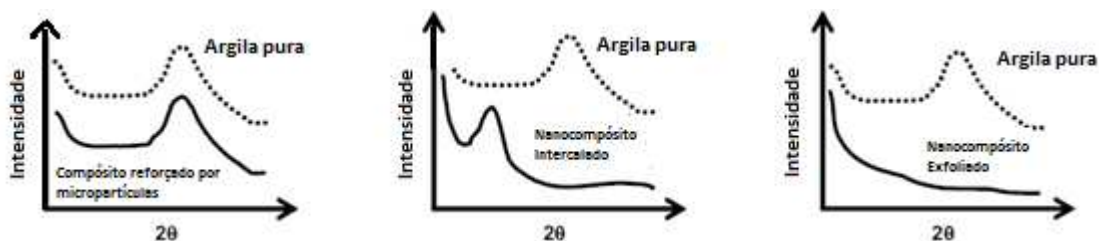


Figura 19-Difratogramas exemplificativos dos três tipos de compósitos resultantes da interação entre filossilicatos e polímeros. Adaptado de [40].

Nesta técnica, o material em estudo é irradiado com um feixe de Raios-X que, colidindo com a rede cristalina da amostra, produz picos reforçados de radiação que constituem o seu padrão de difração característico. Neste contexto, em 1913, Bragg demonstrou, pela primeira vez, a relação existente entre o comprimento de onda dos Raios-X e o respetivo ângulo de incidência com a distância entre as diferentes camadas de átomos. Esta relação é conhecida como Lei de Bragg e apresenta-se da seguinte forma (Equação 1):

$$n\lambda = 2d\sin(\theta) \quad \text{Equação 1}$$

onde  $n$  é um número natural que representa a ordem de difração,  $\lambda$  o comprimento de onda (cdo) dos Raios-X incidentes,  $d$  a distância entre os diferentes planos cristalográficos (espaçamento basal ou neste caso distância interlamelar) e  $\theta$  o ângulo que o raio incidente faz com os planos de reflexão. Importa salientar que existindo uma relação entre a distância  $d$ , o cdo  $\lambda$  dos raios-X e o ângulo de incidência  $\theta$ , as reflexões reforçam-se umas às outras, caso contrário, o feixe produzido é fraco ou nulo [72].

### Procedimento Experimental

Nesta secção efetuaram-se os difratogramas das amostras em pó (obtido por liofilização como descrito em 2.2.3): AASM4N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B e AASC93A; do Quitosano; da Nanofil116®; da Cloisite10A®; da Cloisite15A®; da Cloisite20A®; da Cloisite30B®; e da Cloisite93A®. Para tal, recorreu-se a um difractómetro *Phillips* com Raios-X gerados a partir de uma ampola de cobre ( $\lambda=1,54$  nm) sob um potencial de aceleração de 30kV e um feixe de corrente de 15 mA. Os ângulos de varrimento utilizados foram definidos tendo em atenção os picos de maior intensidade dos diferentes materiais caracterizados.

## 3.2. Caracterização Morfológica

As ME produzidas foram caracterizadas morfolologicamente por microscopia ótica (MO) e microscopia eletrônica de varrimento (MEV).

### 3.2.1. Microscopia Ótica (MO)

A microscopia ótica baseia-se num sistema de lentes formado pelas objetivas e oculares. A objetiva, a primeira lente e a mais próxima do objeto, capta a luz filtrada pelo condensador e projeta uma imagem real, invertida e aumentada da estrutura. A lente ocular, aumenta a imagem projetada pela objetiva, para que seja captada pelo observador [73].

#### **Procedimento Experimental**

De modo a determinar o diâmetro das microesferas produzidas, estas foram observadas utilizando um microscópio ótico de reflexão (*LEICA DMI 5000M, com a fonte LEICA CTR 6500*). As ME observadas possuem na sua composição princípio ativo: AASM4N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B E AASC93A. As imagens foram capturadas em *dark field* e ampliadas 5X. Foi ainda utilizado um sistema de aquisição de imagem para a obtenção das imagens em suporte digital. Já com as imagens em suporte digital, os diâmetros das ME foram medidos com recurso ao *software ImageJ*.

### 3.2.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)

A microscopia eletrónica de varrimento (MEV) é uma técnica de microscopia de elevado poder de ampliação e resolução utilizada, neste contexto, para analisar a morfologia da superfície das ME. Para a obtenção das imagens de MEV, a área da amostra a observar é irradiada por um feixe de eletrões altamente energéticos proveniente de um filamento de tungsténio aquecido que interagem com a amostra gerando, entre outros, eletrões secundários, retrodifundidos, raios-X e eletrões de Auger que são captados por detetores apropriados e convertidos em sinais elétricos. Estes sinais elétricos revelam informação acerca da morfologia externa, da topografia da superfície e da composição química dos materiais constituintes da amostra e são posteriormente convertidos em imagem [74].

### **Procedimento Experimental**

A superfície das microesferas compósitas foi analisada com recurso à microscopia eletrónica de varrimento (MEV), no microscópio Zeiss DSM-962 presente no CENIMAT/ I3N.

As amostras foram fixadas, devidamente espaçadas, num disco metálico com fita-cola de carbono de dupla face que promove o contato elétrico entre este e a superfície da amostra, sendo posteriormente revestidas com uma fina camada de ouro de forma a aumentar a emissão de eletrões e melhorar o contraste da imagem. De acordo com este procedimento foram medidas todas as amostras de ME produzidas.

### **3.3. Grau de Inchamento (*swelling*)**

O grau de inchamento é uma medida da capacidade de uma material absorver água. As determinações do grau de inchamento em função do tempo têm como objetivo estudar a influência, neste parâmetro, da concentração e tipo de argila utilizada na produção das ME compósitas de QS/argila. Os reagentes utilizados encontram-se no Anexo A.

#### **Procedimento experimental**

Foram estudados dois sistemas de ME. No primeiro, de modo a perceber o efeito da variação da concentração de argila, ou seja, variou-se a razão QS:argila. As amostras estudadas foram: M0N, M1N, M2N, M3N, M4N e M5N. Por sua vez, no segundo sistema de dispersões, com o intuito de estudar o efeito dos diferentes tipos de argila, manteve-se a razão Qs:argila e variou-se o tipo de argila utilizada, tendo-se testado as amostras: M4N, C10A, C15A, C20A, C30B e C93A.

Com o intuito de simular os diferentes meios aos quais as ME estarão sujeitas através da toma oral ou da implantação *in situ*, os testes de inchamento deveriam ter sido efetuados em dois meios aquosos distintos: em solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,1 mol / L de pH 1.2, como fluido gástrico simulado (*Simulated Gastric Fluid- SGF*) e em solução tampão de fosfato (*Phosphate Buffered Saline- PBS*) de pH 7.4 que funciona como fluido corporal simulado e como fluido intestinal simulado (*Simulated Intestinal Fluid- SIF*) devido à elevada solubilidade do QS e à fraca reticulação das ME de QS/argila, os estudos de inchamento foram impossíveis de realizar.

Nos testes de inchamento realizado em PBS/SIF: **(i)** cada amostra de ME ( $\approx 100\text{mg}$ ) foi colocada em 150 mL de PBS/SIF (previamente preparado), à temperatura ambiente. **(ii)** Em intervalos regulares (Tabela 9), as ME foram retiradas do meio aquoso, cuidadosamente limpas para retirar o excesso de líquido e a sua massa determinada.

Tabela 9- Intervalos de tempo em que foram efetuadas medidas do grau de inchamento das ME em PBS/SIF.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
<b>Tempos (h)</b>	0,25	0,5	1	2	4	6	10	12	24	36	48

O grau de inchamento das ME molhadas em função do tempo (GI%) foi então determinado de acordo com a Equação 2.

$$GI\% = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde  $m_0$  corresponde à massa inicial das microesferas e  $m_t$  corresponde à massa das microesferas molhadas no tempo  $t$ .

### 3.4. Eficácia de Encapsulação de Fármaco (EE) e Perfil de Libertação Controlada de Fármaco *in vitro* (Drug Release) das microesferas de quitosano/argila/ácido acetilsalicílico

Nesta secção experimental analisou-se a eficácia de encapsulação de fármaco e o perfil de libertação controlada de fármaco *in vitro* dos sistemas de ME produzidos. Os reagentes utilizados encontram-se no Anexo A.

#### Quantificação do Fármaco

A quantificação do fármaco, presente na amostra e libertado ao longo do tempo, foi feita com recurso à técnica de **Espectroscopia do UV-visível**. Esta técnica baseia-se na absorção de radiação, na gama do UV- visível, pelas moléculas dos compostos químicos. A absorção depende da estrutura atómica na qual cada um dos eletrões de um átomo possui um nível de energia associado à sua posição no mesmo, dependendo então das moléculas constituintes do composto em estudo.



De um ponto de vista prático, a medida da absorção de radiação por parte da amostra, é efetuada com recurso à equação de Lambert-Beer (Equação 3).

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon cb \quad \text{Equação 3}$$

onde,  $A$  é a absorvância (sem unidade de medida),  $I$  é a intensidade da luz transmitida pela amostra,  $I_0$  é a intensidade da luz incidente,  $\epsilon$  é coeficiente de absorção molar característica da espécie absorvente ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $c$  é a concentração molar da amostra ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), e  $b$  é a distância percorrida pelo feixe através da amostra ( $\text{cm}$ ).

Desta forma, é possível relacionar a concentração da amostra e a sua respetiva absorvância. Para tal, recorrendo a soluções padrão, ou seja, soluções de concentração conhecida, é possível determinar a sua absorvância e deduzir desta forma a relação linear entre a absorvância e a concentração. Essa relação permite, efetuar o processo inverso, ou seja, determinar a concentração de uma amostra através da leitura da absorvância e aplicando a relação linear determinada anteriormente [75].

### Procedimento Experimental

Em primeiro lugar prepararam-se várias soluções padrão, utilizando o mesmo solvente utilizado nas amostras, de acordo com o seguinte procedimento: **(i)** 25mg de AAS foram dissolvidos em 50mL de PBS, obtendo-se uma concentração de 0.5mg/mL. **(ii)** Partindo desta solução, por diluição da mesma, preparam-se soluções de concentração 0.45, 0.4, 0.35, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.5 e 0.01mg/mL. **(iii)** Para evitar erros de medição (tendo em conta a hidrólise do ácido acetilsalicílico em ácido salicílico, em ambiente aquoso), procedeu-se à hidrólise total do ácido acetilsalicílico presente em cada uma das soluções padrão. Para tal, a cada 1mL de solução padrão foram adicionados 10mL de uma solução de NaOH a 1M. Esta mistura foi aquecida, até ao ponto de ebulição, e posteriormente arrefecida antes da medição da respetiva absorvância [76].

As absorvâncias das soluções padrão foram então medidas de acordo com o seguinte procedimento genérico: **(i)** Colocaram-se 2mL de PBS em cada uma das duas cuvettes de quartzo, colocaram-se as *cuvettes* no suporte do espectrofotómetro e definiu-se uma *baseline*. **(ii)** Substituiu-se o PBS numa da cuvettes por 2mL da solução padrão e obteve-se o respetivo espectro de absorvância para comprimentos de onda entre os 190 e os 400nm (o pico de absorvância pretendido era o do ácido salicílico a 296nm). **(iii)** Repetiu-se o mesmo processo

para todas as concentrações. **(iv)** Finalmente, depois de conhecidos os valores de absorvância, traçou-se um gráfico, da concentração (mg/mL) em função da absorvância, conhecido como reta de calibração. No presente trabalho efetuaram-se retas de calibração, de acordo com o solvente utilizado nas amostras a estudar: uma em solução de TPF (10%(m/m)) (Figura 20), para estudar a eficácia de encapsulação de fármaco, uma em PBS (Figura 21) e uma em SGF (Figura 22), as duas últimas para estudar o perfil de libertação de fármaco *in vitro*.

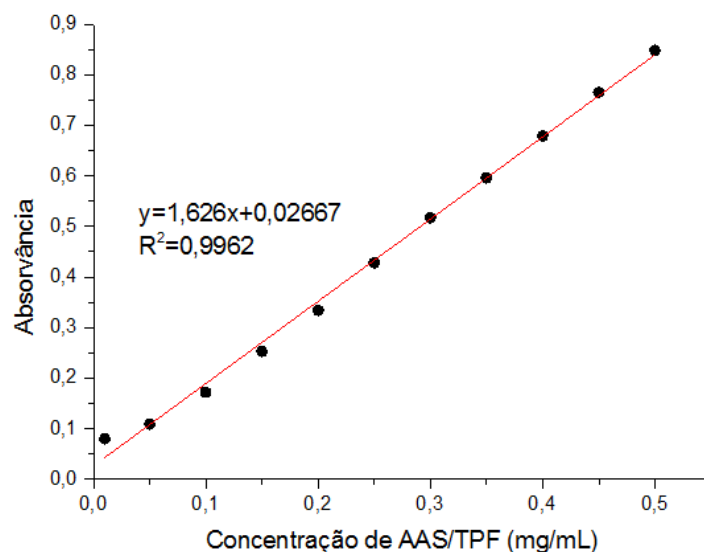


Figura 20- Reta de calibração utilizada no estudo da eficácia de encapsulação de fármaco. Absorvância no comprimento de onda de 296nm em função da concentração de AAS em TPF (mg/mL).

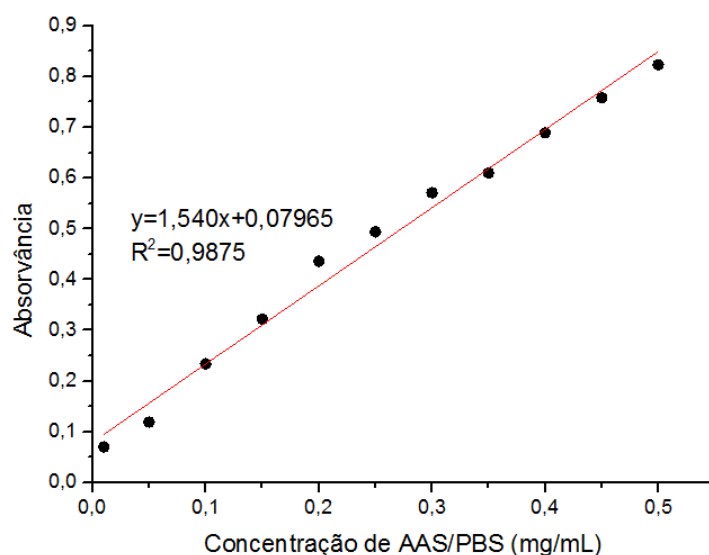


Figura 21- Reta de calibração utilizada no estudo do perfil de libertação de fármaco *in vitro*. Absorvância no comprimento de onda de 296nm em função da concentração de AAS em PBS (mg/mL).

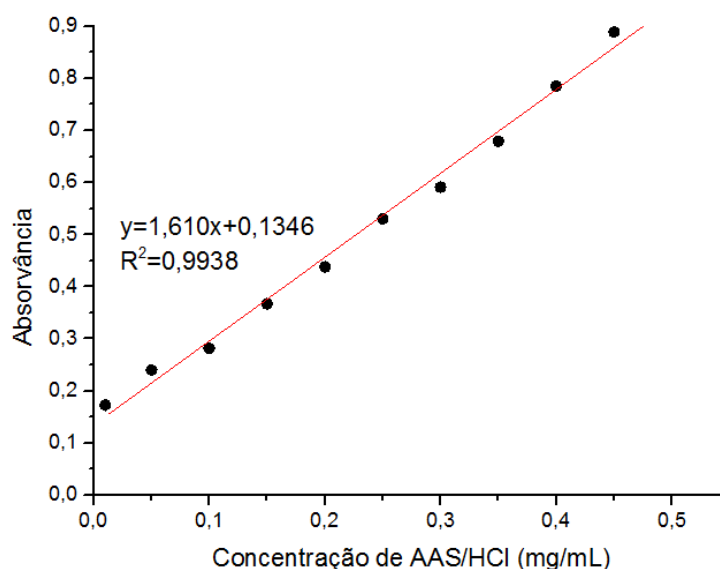


Figura 22- Reta de calibração utilizada no estudo do perfil de liberação de fármaco *in vitro*. Absorvância no comprimento de onda de 296nm em função da concentração de AAS em HCl (mg/mL).

Nas diferentes amostras estudadas, antes da medição das suas absorvâncias, procedeu-se, igualmente, à hidrólise total do ácido acetilsalicílico, de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Os espectros de UV-visível foram então obtidos de acordo com o procedimento genérico descrito anteriormente e, depois de conhecido o valor de absorvância a 296nm de cada uma das amostras, foi possível, através das equações de linearidade obtidas nas retas de calibração, calcular a concentração de AAS presente em cada uma delas.

### 3.4.1. Eficácia de Encapsulação de Fármaco

No presente trabalho, a eficácia de encapsulação permitiu avaliar, como o nome indica, a eficácia de encapsulação do AAS nas ME.

#### Procedimento Experimental

A quantidade de AAS, efetivamente, encapsulado nas ME foi calculada pela quantificação do fármaco que ficou retido na solução reticulante (de TPF) aquando da preparação das ME. Recorreu-se à espectroscopia do UV-visível (como descrito no ponto Quantificação do fármaco). Ou seja, sabendo a quantidade de AAS que foi colocado nas dispersões precursoras das ME e determinando a quantidade perdida por estas na solução de TPF é possível aferir a quantidade que ficou encapsulada. Esta metodologia foi adotada de [66, 68]. A quantidade de fármaco

perdido nas lavagens das ME foi considerada nula tendo em conta a baixa solubilidade do AAS em água [61].

Sabendo a quantidade de fármaco encapsulado pelas ME, foi então calculada a EE recorrendo à seguinte equação (Equação 4):

$$EE\% = \frac{T-L}{T} \times 100\% \text{ Equação 4}$$

onde,  $T$  é a quantidade total de fármaco colocado nas dispersões precursoras das ME e  $L$  é a quantidade de fármaco libertado na solução reticulante.

Nesta secção foram determinadas as EE das seguintes amostras de ME: AASM0N, AASM1N, AASM2N, AASM3N, AASM4N, AASM5N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B e AASC93A. Para permitir uma análise estatística dos resultados, para todas as amostras foram efetuadas três medições distintas.

### 3.4.2. Perfil de Libertação Controlada de Fármaco

Existem diversos modelos que estudam o perfil de libertação dos SLC pois, a libertação de um fármaco a partir de uma matriz de base polimérica é um processo complexo e que envolve vários processos de difusão.

Contudo, em SLC onde o mecanismo fundamental de libertação de fármaco é a difusão, a equação comumente utilizada é a equação empírica proposta por Ritger e Peppas (Equação 5) [77].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \text{ Equação 5}$$

onde,  $M_t/M_\infty$  é a fração de droga libertada em função do tempo  $t$ ,  $k$  é uma constante característica do SLC utilizado (da interação entre a droga e o polímero) e  $n$  é um parâmetro empírico caracterizador do mecanismo de libertação (expoente difusional). Com base no expoente difusional o transporte de fármaco pode ser classificado como: transporte Fickiano, caso este obedeça às leis de Fick, ou seja para  $n = 0.5$ ; transporte II quando  $n = 1$ ; transporte não Fickiano ou anómalo quando  $0.5 > n < 1$ ; e transporte super Caso II quando  $n > 1$  [78].

Quando o transporte de fármaco possui um comportamento Fickiano, a velocidade de difusão do solvente para o interior da matriz é elevada em contraste com uma baixa velocidade de relaxamento polimérico. O que induz a formação de um gradiente de penetração do solvente na matriz. Contrariamente, em transportes de fármaco não-Fickianos, as cadeias poliméricas não apresentam mobilidade suficiente para permitir uma rápida absorção matricial [78].

### **Procedimento Experimental**

Inicialmente, e com o intuito de simular os diferentes meios aos quais as ME estarão sujeitas através da toma oral, o perfil de liberação controlada de fármaco *in vitro* foi efetuado em dois meios aquosos distintos durante um máximo de 10h: em solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,1 mol/L de (pH 1,2) como fluido gástrico simulado (SGF) e em solução tampão de fosfato (PBS) de (pH 7,4) como fluido intestinal simulado (SIF).

Posteriormente, e tendo em mente uma liberação controlada de fármaco de longa duração, num sistema implantável (ex: lacunas ósseas), efetuou-se um estudo do perfil de liberação controlada de fármaco *in vitro* em PBS de (pH=7,4), que vai funcionar como fluido corporal simulado, durante um máximo de 10 dias.

Em ambos os casos, aproximadamente 100mg de ME de cada amostra (AASM4N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B e AASC93A) foram colocados em 150mL de solução aquosa em constante agitação (120 rpm), à temperatura ambiente. Em intervalos regulares (Tabelas 10 e 11) foram retirados 3mL de solução que foram repostos com solução nova, mantendo-se desta forma o volume inicial. A quantidade de fármaco presente em cada amostra de 3mL retirada foi determinada recorrendo à espectroscopia do UV- visível, como foi descrito em Quantificação do fármaco.

Tabela 10- Intervalos de tempo nos quais foram efetuadas medidas da quantidade de fármaco libertado, mimetizando a toma oral.

Meio Aquoso	Tempos (h)							
SGF	0,25	0,5	1	2	4	6	10	12
SIF	0,25	0,5	1	2	4	6	10	12

Tabela 11- Intervalos de tempo nos quais foram efetuadas medidas da quantidade de fármaco libertado, tendo em mente um sistema de libertação controlada de fármacos de longa duração implantável (ex: lacunas ósseas). \*(a partir deste ponto as amostras foram retiradas diariamente até aos 10 dias).

Meio Aquoso	Tempos (h)										
SGF	0,25	0,5	1	2	4	6	10	12	24*	....	240 (10dias)

### 3.5. Testes de Citotoxicidade

Com o crescente controlo em relação ao uso de animais em laboratório, há cada vez mais a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* (testes de citotoxicidade) que possam detetar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais, que não devem causar reações adversas, nem lesar o organismo do paciente. Uma vez que este trabalho visa a libertação controlada de fármacos, quer seja por via oral ou implantável (lacunas ósseas), torna-se necessário verificar a eventual toxicidade dos SLC desenvolvidos.

Os testes de citotoxicidade podem ser efetuados por método direto ou indireto. No método direto, como o nome indica, o material é colocado em contato com a cultura celular estudando-se assim os efeitos adversos do mesmo nas células. No método indireto, adotado neste trabalho, o material é colocado em contato com o meio de cultura, obtendo-se o extrato do material, que mais tarde será colocado em contato com as células, neste caso células Vero [79].

**Materiais**

Os materiais utilizados nesta etapa experimental encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12-Materiais utilizados nos testes de citotoxicidade.

<b>Materiais</b>	<b>Especificações</b>	<b>Fornecedor</b>
<b>Meio de cultura celular</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM+GlutaMAX™)	Invitrogen
<b>Linha Celular</b>	Vero	-
<b>Indicador de viabilidade</b>	PrestoBlue™	Invitrogen

**Procedimento Experimental**

As ME estudadas e as suas %(m/m) de argila e QS encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13- Sistemas de ME utilizados nos testes de citotoxicidade.

<b>Amostra de ME</b>	<b>Massa total (mg)</b>	<b>Massa de Quitosano em 100mg de microesferas (mg)</b>	<b>Argila utilizada na produção da amostra</b>	<b>Massa de Argila em 100mg de microesferas (mg)</b>
<b>M0N</b>	100	100	-	-
<b>M4N</b>	100	60	Nanofil116®	40
<b>C10A</b>	100	60	Cloisite10A®	40
<b>C15A</b>	100	60	Cloisite15A®	40
<b>C20A</b>	100	60	Cloisite20A®	40
<b>C30B</b>	100	60	Cloisite30B®	40
<b>C93A</b>	100	60	Cloisite93A®	40

O método adotado para os testes de citotoxicidade foi o método indireto. As diferentes amostras (100mg de massa total) foram colocadas em contacto com 1mL de meio de cultura celular durante 24h a 37°C, obtendo-se desta forma diferentes extratos para o estudo de citotoxicidade. Os diferentes extratos foram então diluídos em série sempre com um fator de 2 e colocados em contato com as células Vero, previamente cultivadas como descrito no Anexo

B. Para uma melhor compreensão, as concentrações equivalentes dos extratos colocados em contato com as células encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14- Concentrações equivalentes dos extratos utilizados nos testes de citotoxicidade.

Amostra		Concentração Equivalente do Extrato da amostra (mg/mL)							
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
MON	Concentração Equivalente de quitosano (mg/mL)	100,00	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78
	Concentração Equivalente de argila (mg/mL)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
M4N/C10A/ C15A/C20A/ C30B/C93A	Concentração Equivalente de quitosano (mg/mL)	60,00	30,00	15,00	7,50	3,75	1,88	0,94	0,47
	Concentração Equivalente de argila (mg/mL)	40,00	20,00	10,00	5,00	2,50	1,25	0,63	0,31

Para garantir a reprodutibilidade dos resultados, todos os ensaios foram realizados com três réplicas. Nas Figuras 23 e 24 encontram-se as representações esquemáticas das microplacas utilizadas nos testes de citotoxicidade.



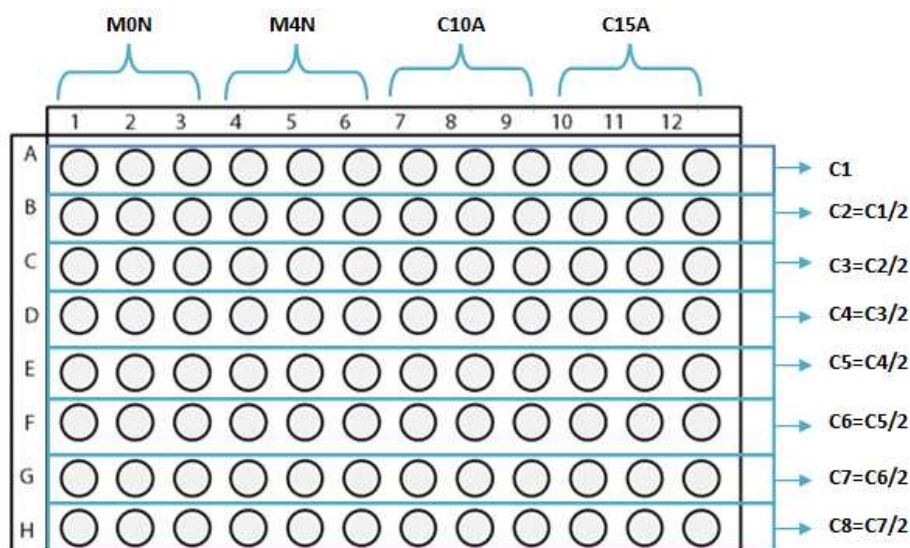


Figura 23- Esquema representativo da microplaca de 96 poços utilizada para os testes de citotoxicidade das amostras M0N, M4N, C10A e C15A.

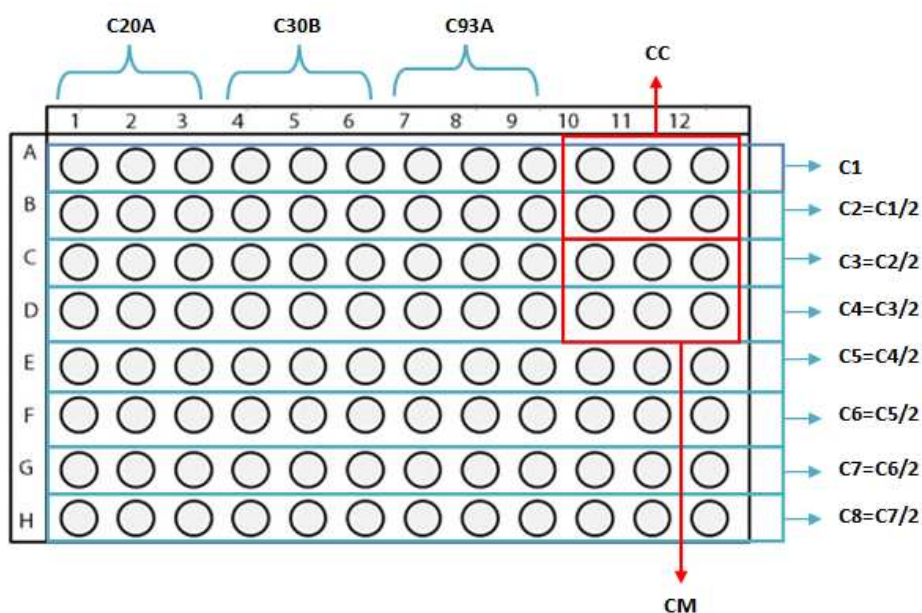


Figura 24- Esquema representativo da microplaca de 96 poços utilizada para os testes de citotoxicidade das amostras C20A, C30B e C93A. Onde se encontram também os controles de células (C.C.) e de meio (C.M.).

O controle de meio (CM) é utilizado para corrigir os resultados, subtraindo a absorvância do meio de cultura celular e do indicador de viabilidade. O controle de células (CC) é utilizado como referência para os resultados obtidos nos diferentes ensaios (Figura 24). A viabilidade das células do CC é considerada máxima, uma vez que estas apenas se encontram em contato com o meio de cultura celular, em condições ótimas.

Depois de 24h de incubação das células em contacto com os extratos a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub>, adicionou-se a cada um dos poços o reagente PrestoBlue™ a 10% (v/v) em relação ao meio (100µL). Este reagente consiste numa solução de resazurina que é metabolizada e transformada em resorufina pelas células vivas, provocando uma alteração da cor da solução. Posteriormente, para determinar a compatibilidade celular dos extratos procedeu-se a uma leitura da absorvância de cada amostra, recorrendo a um leitor de microplacas *Tecan Infinite M200*. Comparando os resultados obtidos para os CC e os obtidos para as diferentes amostras, consegue então avaliar-se o efeito citotóxico das amostras em estudo.

## 4. ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS

### 4.1. Caraterização Físico-Química e Estrutural

#### 4.1.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR- FTIR)

Com o intuito de confirmar, através da identificação dos seus grupos funcionais, a presença quer do QS quer da argila nos sistemas de libertação formulados foram realizados espectros de FTIR de todas as ME sem princípio ativo encapsulado (M0N, M1N, M2N, M3N, M4N, M5N, C10A, C15A, C20A, C30B e C93A).

Os espectros de FTIR do QS e das ME produzidas apenas com QS (M0N) encontram-se na Figura 25, os seus principais modos de vibração estão identificados na Tabela 15.

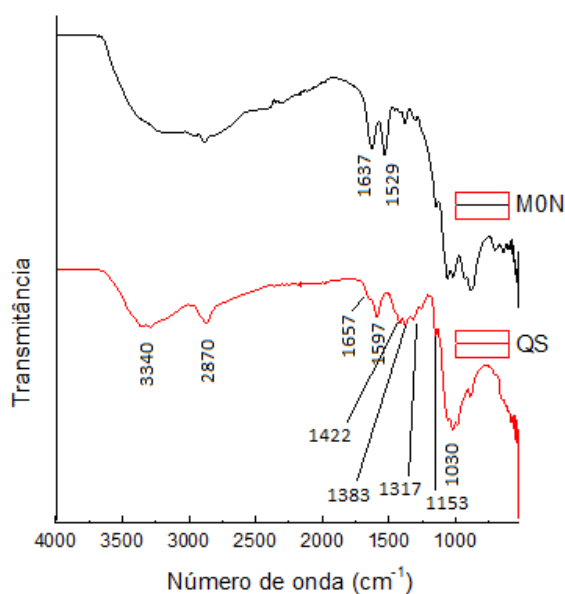


Figura 25- Espectros de FTIR do QS e da amostra M0N.

Tabela 15- Principais modos de vibração identificados no QS e na amostra MON [2].

Amostra	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modo de vibração
QS	3340	Estiramento axial do (O-H) que se sobrepõe à banda de estiramento do (N-H)
	2870	Estiramento das ligações C-H
	1657	Vibração (C=O) da amida I
	1597	Vibração (N-H) do grupo amina da amida II
	1422/1383	Deformação simétrica do ( $\text{CH}_3$ )
	1317	Vibração ( $\text{CH}_3$ ) da amida III
	1153/1030	Vibrações (C-O-C)
MON	1637	Vibração (C=O) da amida I
	1529	Vibração (N-H) da amida II

A deslocação dos picos correspondentes à vibração da ligação C=O da amida I e à vibração N-H do grupo amina da amida II de  $1657 \text{ cm}^{-1}$  e de  $1597 \text{ cm}^{-1}$  para  $1657 \text{ cm}^{-1}$  e  $1597 \text{ cm}^{-1}$ , respetivamente, depois da formação das ME com TPF, pode ser atribuída à ligação entre o TPF e os grupos amina do QS. Este comportamento permite confirmar a reticulação do QS que, por sua vez vai reduzir a sua solubilidade e contribuir para a separação do QS da solução, na forma de esferas [66].

Na Figura 26 encontram-se os espetros de FTIR do QS, da argila Nanofil116® e do sistema de ME M4N. Estes espetros foram efetuados com o intuito de verificar a presença e influência da adição de MMT nas ME produzidas. Os principais modos de vibração destas amostras encontram-se na Tabela 16.

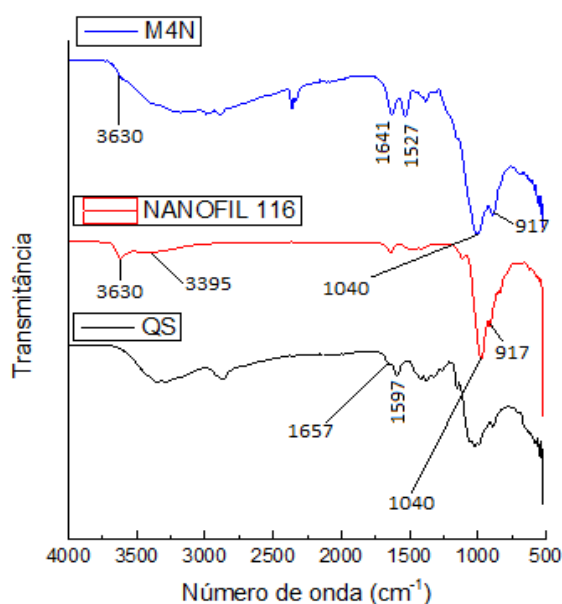


Figura 26- Espectros de FTIR do QS, da argila Nanofil 116® e da amostra M4N.

Tabela 16- Principais modos de vibração identificados no QS, na argila Nanofil116® e na amostra M4N [2, 66].

Amostra	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Modo de vibração
Nanofil116®	3630	Estiramento do (O-H) em (Al-OH) e (Si-OH)
	3395	Estiramento do (O-H) da água
	1040	Vibração (Si-O-Si) do silicato
	917	Vibração (Al-OH-Al) do aluminato
	1637	Vibração (C=O) da amida I
	1529	Vibração (N-H) da amida II
Quitosano	1657	Vibração (C=O) da amida I
	1597	Vibração (N-H) do grupo amina da amida II
M4N	3630	Estiramento do (O-H) em (Al-OH) e (Si-OH)
	1641	Vibração (C=O) da amida I
	1527	Vibração (N-H) do grupo amina da amida II
	1040	Vibração (Si-O-Si) do silicato
	917	Vibração (Al-OH-Al) do aluminato

Como pode ser observado na Figura 26 e na Tabela 16, a amostra M4N apresenta picos característicos da argila Nanofil116® e do QS, comprovando-se desta forma a presença de ambos na amostra. Verifica-se ainda que os picos correspondentes à vibração C=O da amida I e à Vibração N-H do grupo amina da amida II a  $1657\text{ cm}^{-1}$  e de  $1597\text{ cm}^{-1}$  se deslocam para  $1641\text{ cm}^{-1}$  e  $1527\text{ cm}^{-1}$ , respetivamente. Esta deslocação é ligeiramente maior que a encontrada na amostra MON, podendo, neste caso, ser atribuída: (i) à ligação entre grupos amina do QS e o TPF; (ii) ou à interação entre a estrutura da argila, carregada negativamente, e os grupos amina do QS. [2, 66, 80].

Na Figura 27 encontram-se os espectros de FTIR das amostras produzidas com diferentes %(m/m) de MMT. Com este estudo era pretendido verificar a influência da %(m/m) de MMT utilizada na estrutura das ME produzidas.

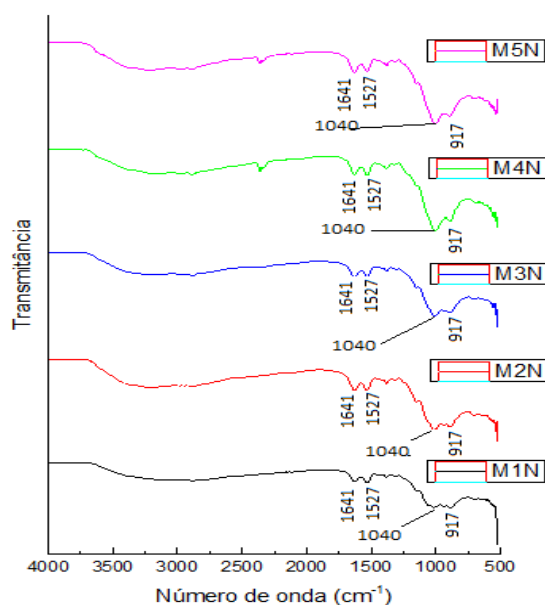


Figura 27- Espectros de FTIR das amostras M1N, M2N, M3N, M4N e M5N.

Como pode ser observado na Figura 27, as amostras M1N, M2N, M3N, M4N e M5N, apresentam picos característicos da argila Nanofil116® e do QS, e um comportamento semelhante ao descrito para M4N. Observa-se ainda que a %(m/m) de MMT utilizada não influencia a posição dos picos, encontrando-se estes nas mesmas posições nas várias amostras. No entanto, tal como esperado verifica-se um aumento de intensidade dos picos característicos da Vibração (Si-O-Si) do silicato a  $1040\text{ cm}^{-1}$  e Vibração (Al-OH-Al) do aluminato presente a  $917\text{ cm}^{-1}$ .

Por fim, foram efetuados os espectros de FTIR das amostras C10A, C15A, C20A, C30B e C93A e estes foram comparados aos espectros das argilas orgânicas (Cloisite10A®, Cloisite15A®, Cloisite20A®, Cloisite30B® e Cloisite93A®) e do QS. Os espectros de FTIR destas amostras encontram-se nas Figuras 28, 29, 30, 31 e 32. Na Tabela 17 encontram-se os principais modos de vibração identificados.

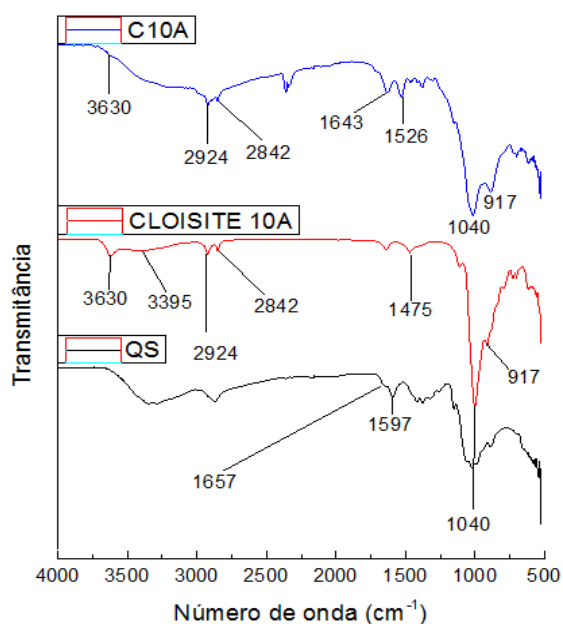


Figura 28- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite10A® e da amostra C10A.

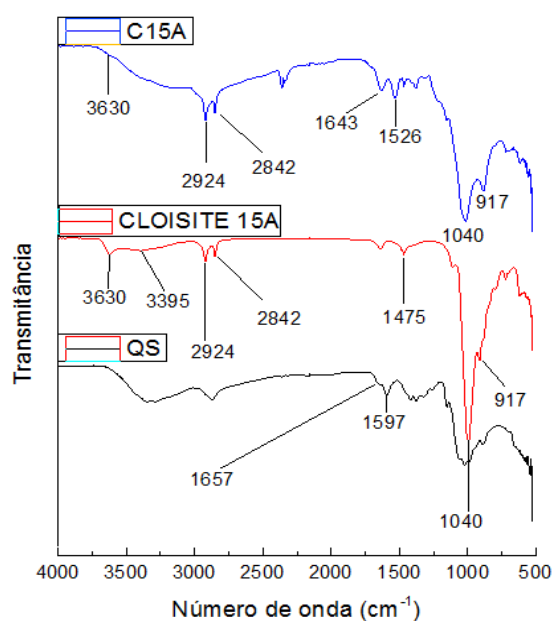


Figura 29- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite15A® e da amostra C15A.

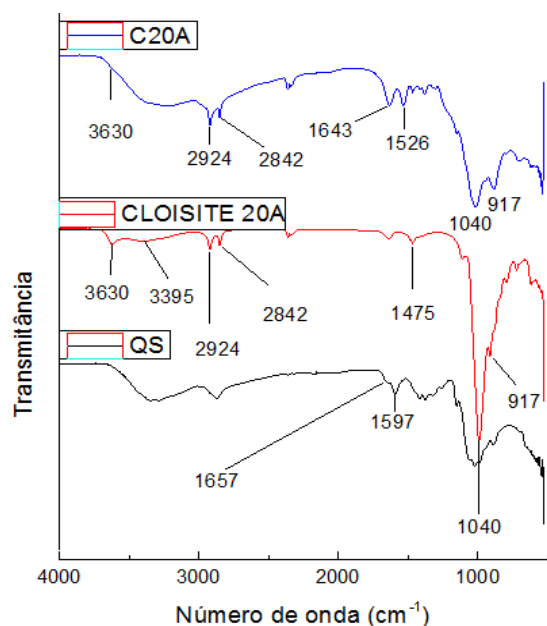


Figura 30- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite20A® e da amostra C20A.

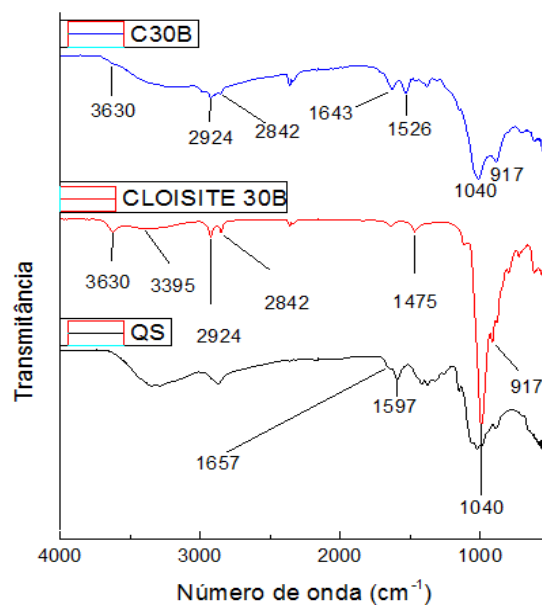


Figura 31- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite30B® e da amostra C30B.

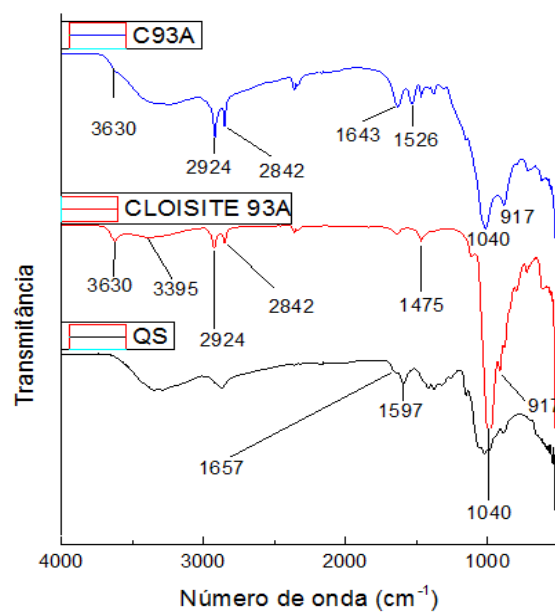


Figura 32- Espectros de FTIR do QS, da argila Cloisite93A® e da amostra C93A.



Tabela 17- Principais modos de vibração identificados no QS, nas argilas orgânicas (Cloisite10A®, Cloisite15A®, Cloisite20A®, Cloisite30B® e Cloisite93A®) e nas amostras C10A, C15A, C20A, C30B e C93A [2, 65].

Amostra	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Modo de vibração
Cloisite10A®/Cloisite15A®/ Cloisite20A®/Cloisite30B®/ Cloisite93A®	3630	Estiramento do (O-H) em (Al-OH) e (Si-OH)
	3395	Estiramento do (O-H) da água
	2924	Estiramento assimétrico do (C-H) dos grupos metileno
	2842	Estiramento simétrico do (C-H) dos grupos metileno
	1475	Deformação do (C-H) dos grupos metileno
	1040	Vibração (Si-O-Si) do silicato
	917	Vibração (Al-OH-Al) do aluminato
QS	1657	Vibração (C=O) da amida I
	1597	Vibração (N-H) do grupo amina da amida II
C10A/C15A/ C20A/C30B/ C93A	3630	Estiramento do (O-H) em (Al-OH) e (Si-OH)
	3395	Estiramento do (O-H) da água
	2924	Estiramento assimétrico do (C-H) dos grupos metileno
	2842	Estiramento simétrico do (C-H) dos grupos metileno
	1643	Vibração (C=O) da amida I
	1526	Vibração (N-H) do grupo amina da amida II
	1040	Vibração (Si-O-Si) do silicato
	917	Vibração (Al-OH-Al) do aluminato

Como pode ser observado nas Figuras 28, 29, 30, 31 e 32 e, na Tabela 17 as amostras C10A, C15A, C20A, C30B e C93A apresentam picos característicos das argilas orgânicas e do QS, comprovando-se desta forma a presença de ambos nas amostras. Verifica-se ainda, mais uma vez, que os picos correspondentes à vibração da ligação C=O da amida I e à vibração da ligação N-H do grupo amina da amida II a 1657 cm<sup>-1</sup> e de 1597 cm<sup>-1</sup> se deslocam, neste caso para 1643 cm<sup>-1</sup> e 1526 cm<sup>-1</sup>, respetivamente.

### 4.1.2. Difração de Raios X (DRX)

Neste trabalho a difração de Raios-X foi utilizada para avaliar a intercalação/exfoliação do QS e do AAS nas galerias da argila. Observando a posição, forma e intensidade das reflexões basais (picos de difração) do filossilicato, é possível identificar a estrutura do compósito. Neste contexto foram então efetuados os difratogramas das amostras AASM4N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B e AASC93A. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 33, 34, 35, 36, 37 e 38.

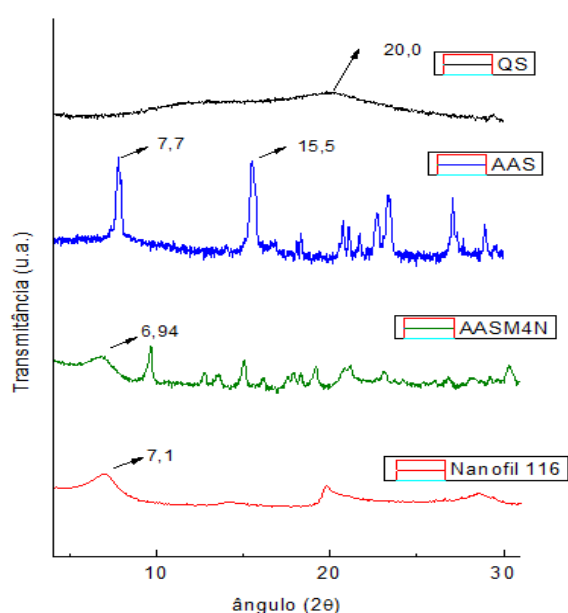


Figura 33- Difratogramas do QS, AAS, da argila Nanofil ®116 e da amostra AASM4N.

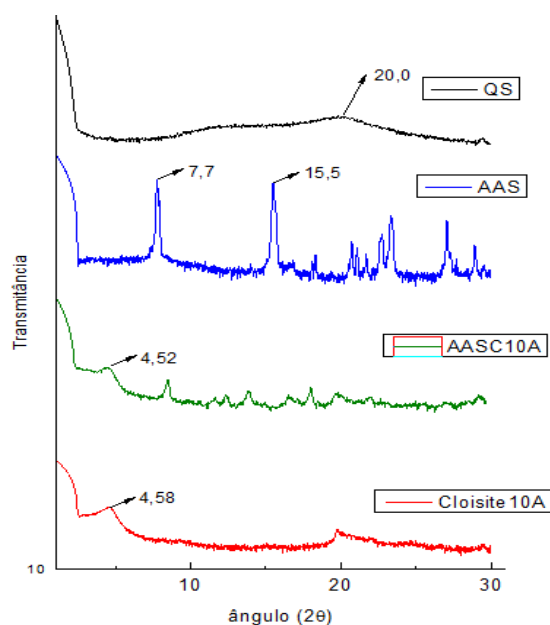
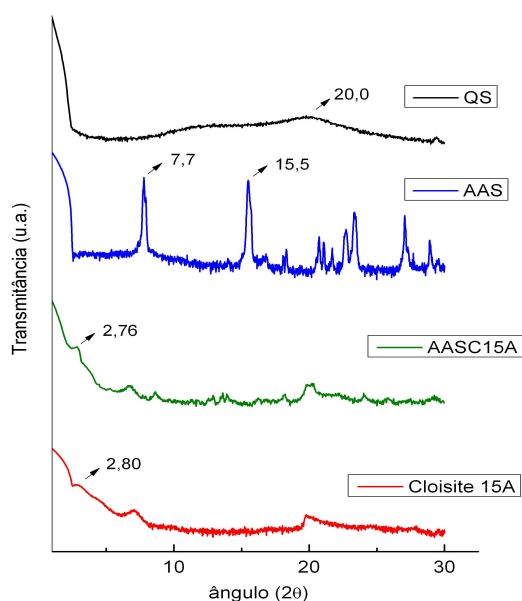


Figura 34- Difratogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®10A e da amostra AASC10A.



Figuras 35- Difratogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®15A e da amostra AASC15A.

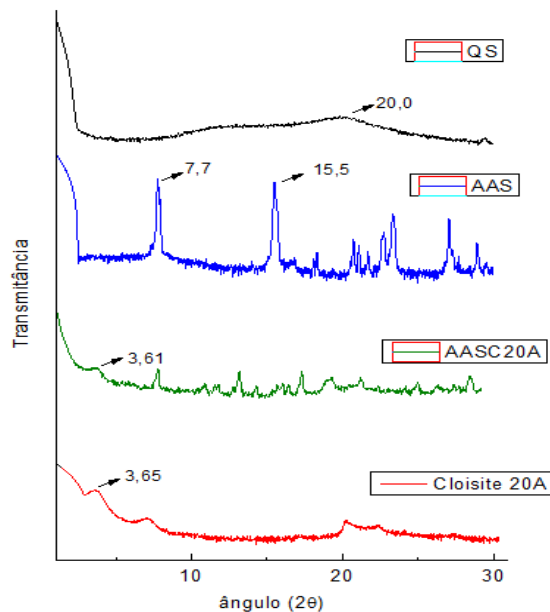


Figura 36- Difratogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®20A e da amostra AASC20A.

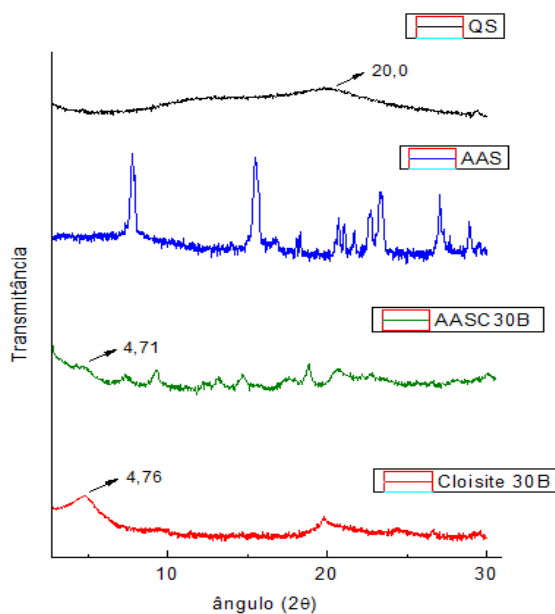


Figura 37- Difratogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®30B e da amostra AASC30B.

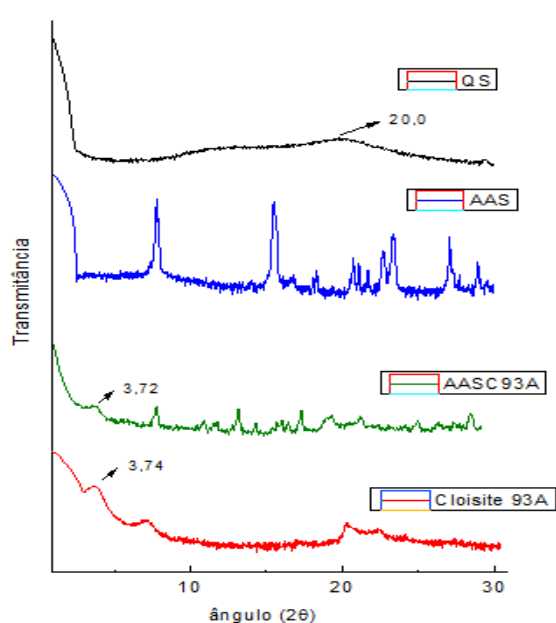


Figura 38- Difratogramas do QS, do AAS, da argila Cloisite®93A e da amostra AASC93A.

Como pode ser observado nas Figuras 33, 34, 35, 36, 37 e 38, para todas as %(m/m) de argila e para todas as diferentes argilas estudadas, comparando a argila pura ao sistema de ME produzidas com esta, o padrão de difração manteve-se aproximadamente igual, não se observando o aumento do espaçamento basal. Este comportamento é característico de amostras nas quais a argila não se encontra exfoliada ou intercalada, tendo-se obtido apenas compósitos reforçados por micropartículas, estes compósitos são mecanicamente mais frágeis

que os nanocompósitos (intercalados/exfoliados) [40, 66]. Em todas as amostras é possível identificar um pico de difração em  $2\theta=20$ , pertencente ao QS, bem como os picos pertencentes ao AAS ( $2\theta=7.7$  e  $2\theta=15.5$ ) apesar de nas amostras de ME os últimos se encontrarem ligeiramente desviados.

Os valores do espaçamento basal das argilas puras e das amostras de ME, calculados através da Equação 2, assim como a diferença entre ambos, encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18-Valores obtidos para o espaçamento basal.

Amostra	$2\theta(^{\circ})$	Espaçamento basal (nm)	Diferença entre o espaçamento basal da amostra de ME e o espaçamento basal da respectiva argila pura (nm)
Nanofil116®	7,10	1,24	0,03
AASM4N	6,94	1,27	
Cloisite10A®	4,58	1,93	0,02
AASC10A	4,52	1,95	
Cloisite15A®	2,80	3,15	0,05
AASC15A	2,76	3,20	
Cloisite20A®	3,65	2,42	0,03
AASC20A	3,61	2,45	
Cloisite30B®	4,76	1,86	0,01
AASC30B	4,71	1,87	
Cloisite93A®	3,74	2,36	0,01
AASC93A	3,72	2,37	

Como pode ser observado pelos valores de espaçamento basal obtidos (Tabela 18), não ocorreu a intercalação/exfoliação das argilas, pois o aumento do espaçamento basal foi praticamente nulo em todas as amostras. O QS foi apenas adsorvido à superfície da argila, este resultado está de acordo com o obtido por Shuibo Hua *et. al* e por Debasish Sahoo *et. al* [5, 66]. Este fato pode estar relacionado com a elevada área superficial da argila (nanoargila) e a

elevada %(m/m) da mesma utilizada na produção das ME. Para ultrapassar este obstáculo teria que se utilizar %(m/m) mais baixas de argila, e aumentar o tempo de ‘expansão’ da argila (aproximadamente 24 horas) em ácido acético, antes da adição do AAS e do QS, de forma a promover o ‘inchamento’ da argila e o aumento do espaçamento basal, seria também necessário proceder ao aumento do tempo de sonicação das amostras em estudo para promover uma melhor dispersão da argila. A utilização de um fármaco catiónico seria uma mais valia à intercalação do mesmo nas galerias da argila.

Quanto às argilas orgânicas, sabe-se que são montemorilonites organicamente modificadas, com um sal de amónio quaternário, e com características hidrofóbicas. Este fato, apesar da presença do grupo hidroxilo (promotor de ligações por pontes de hidrogénio) nas suas galerias, dificulta a sua dispersão em soluções aquosas e a formação de ligações intermoleculares entre si e o QS ou o AAS [5].

## 4.2. Caraterização Morfológica

### 4.2.1. Microscopia Ótica (MO)

Neste estudo, a MO foi utilizada para determinar o diâmetro das ME: AASM0N, AASM1N, AASM2N, AASM3N, AASM4N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B E AASC93A. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 39 e 40.

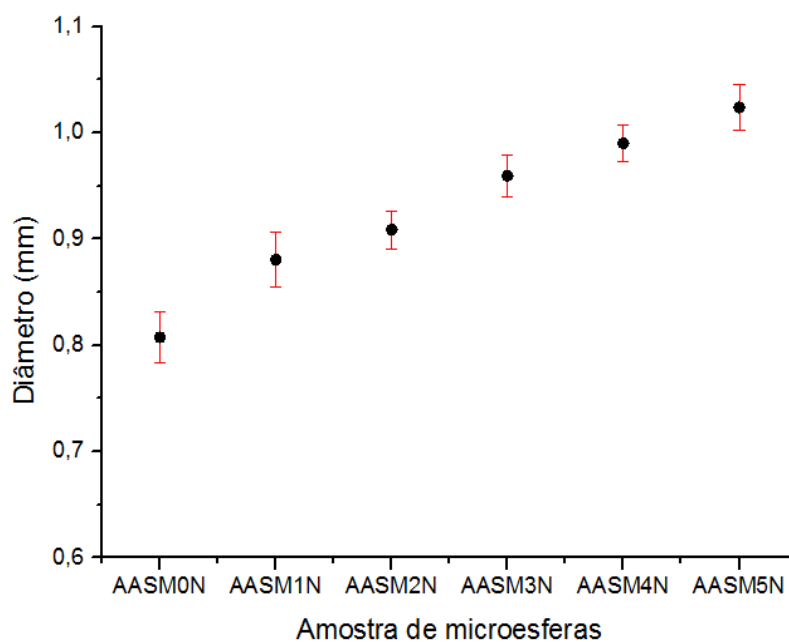


Figura 39- Diâmetros das ME: AASM0N, AASM1N, AASM2S, AASM3N, AASM4N e AASM5N.

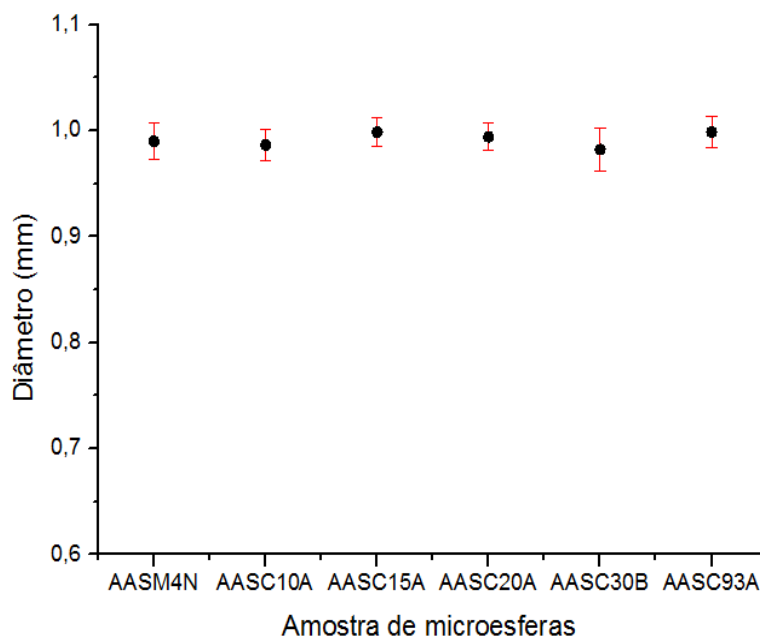


Figura 40- Diâmetros das ME: AASM4N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B e AASC93A.

Pela observação da Figura 39 é possível concluir que, contrariamente ao obtido por Shuibo Hua *et. al* [66], a adição e aumento da %(m/m) de argila aumentam o diâmetro das ME. Este fato está, possivelmente, relacionado com a presença de uma elevada quantidade de argila (de área superficial específica elevada) um efeito de concentração (quanto maior a quantidade de

sólidos maior será o diâmetro). Quanto às ME produzidas com argilas orgânicas, Figura 40, apenas se conclui que os seus diâmetros são da ordem do diâmetro das ME produzidas com MMT (para uma mesma %(m/m) de argila). Não se verificando qualquer influência da adição de surfatantes às argilas.

Encontram-se de seguida, a título exemplificativo, imagens de MO das amostras AASM0N (Figura 41 A) e AASM4N (Figura 41 B).

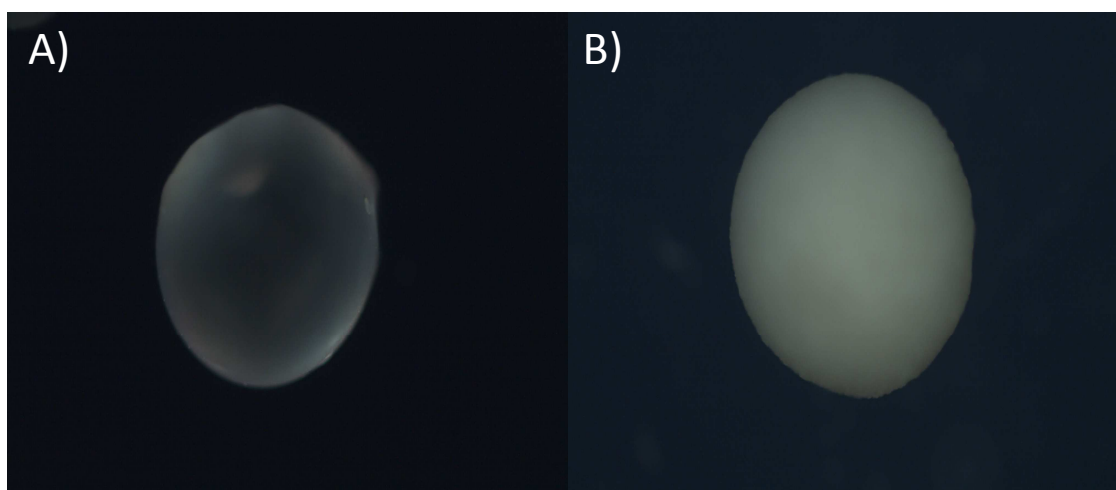


Figura 41- Imagens obtidas com recurso à MO (ampliação de 5x) de: A)- AASM0N; B)- AASM4N.

Pela observação da Figura 41 foi possível confirmar a morfologia esférica das ME.

#### 4.2.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)

A morfologia da superfície das ME produzidas foi observada com recurso a MEV. Para tal, observaram-se as amostras de ME: AASM0N, AASM1N, AASM2N, AASM3N, AASM4N, AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B E AASC93A. As imagens obtidas encontram-se nas Figuras 42, 43, 44, 45, 46 e 47.



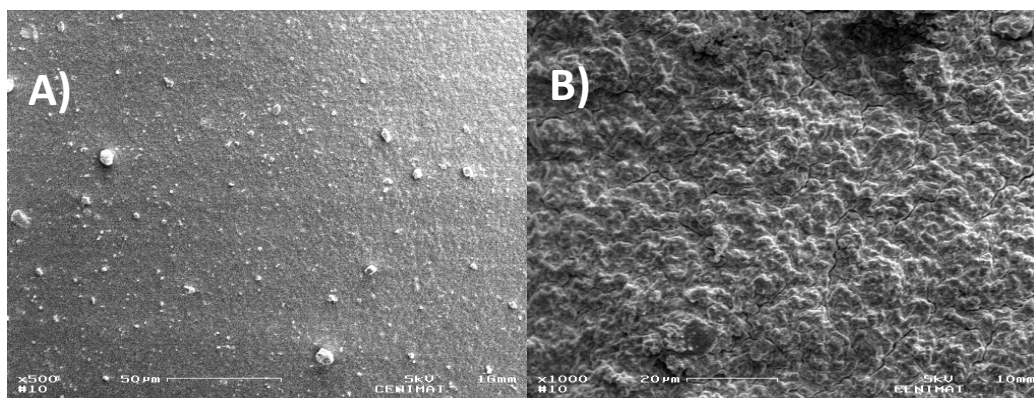


Figura 42- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASM0N com uma ampliação de 500x; B) Superfície da amostra AASM1N com uma ampliação de 1000x.

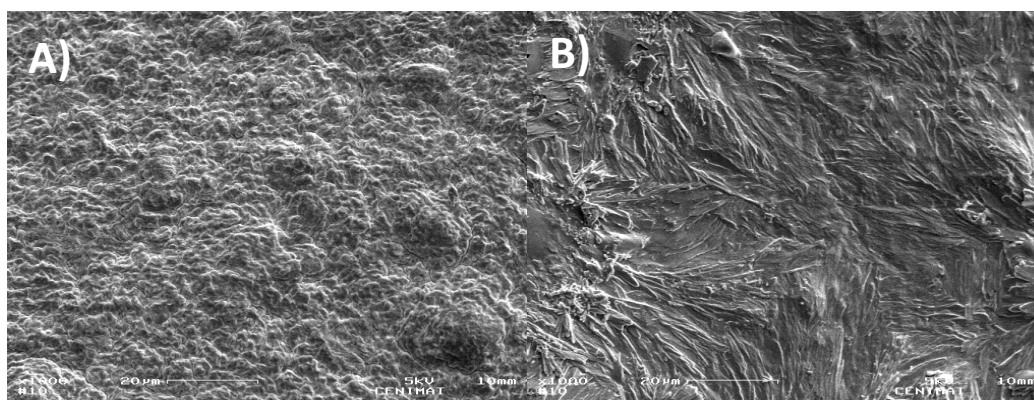


Figura 43- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASM2N com uma ampliação de 1000x; B) Superfície da amostra AASM3N com uma ampliação de 1000x.

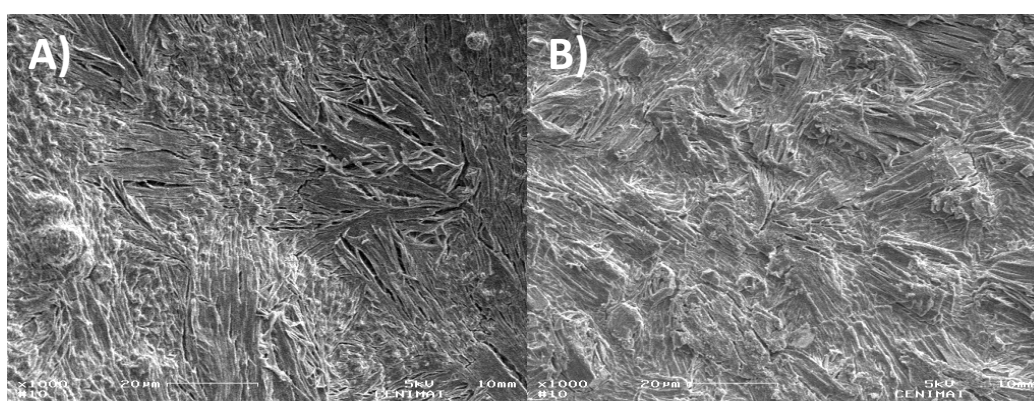


Figura 44- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASM4N com uma ampliação de 1000x; B) Superfície da amostra AASM5N com uma ampliação de 1000x.

Comparando as microesferas apenas de QS, Figura 42 A, com as microesferas nas quais é incluída a argila, Figuras 42-B, 43 e 44, observa-se que as mesmas deixam de ter uma superfície lisa e sem defeitos para passarem a ter uma superfície rugosa com aglomerados, indicativa da presença de argila não dispersa. O aumento da %(m/m) de argila utilizada



provoca, como pode ser observado nas figuras, um aumento da presença de argila (não dispersa) na superfície das ME. Observa-se ainda a não porosidade das ME.

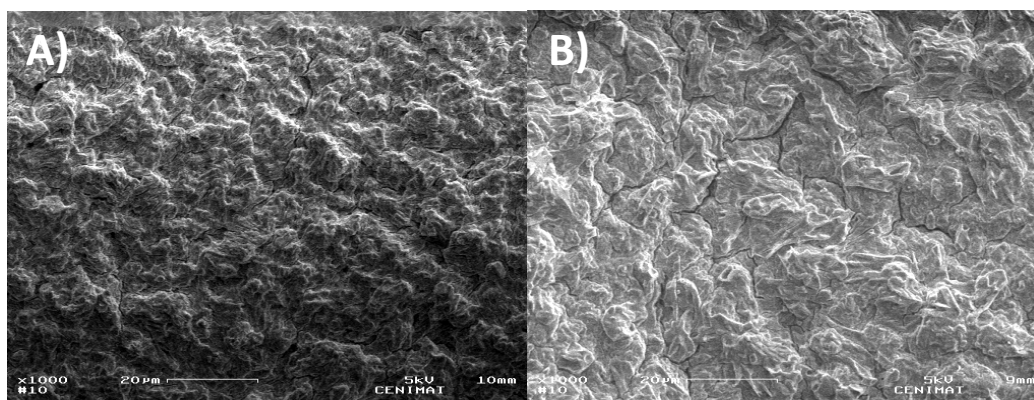


Figura 45- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASC10A com uma ampliação de 1000x; B) Superfície da amostra AASC15A com uma ampliação de 1000x.

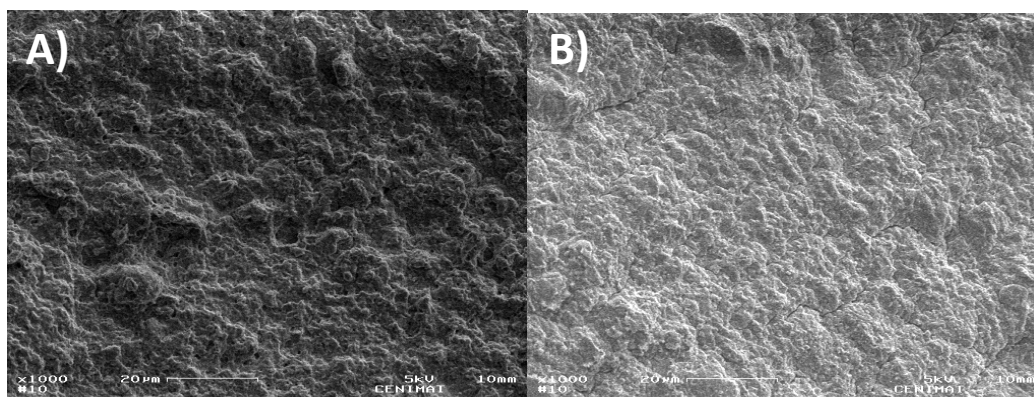


Figura 46- Imagens obtidas com recurso a MEV de : A) Superfície da amostra AASC20A com uma ampliação de 1000x; B) Superfície da amostra AASC30B com uma ampliação de 1000x.

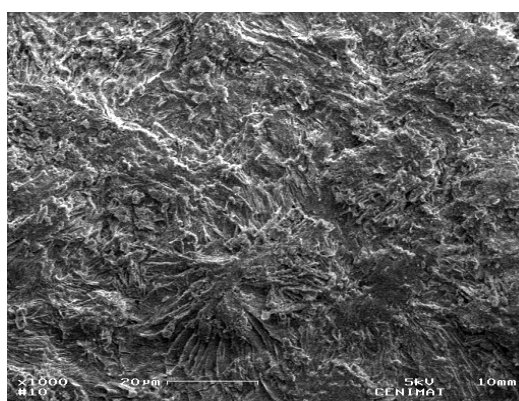


Figura 47- Imagem da superfície de AASC93A, ampliada 1000x obtida com recurso a MEV.

Pela análise das Figuras 45, 46 e 47, é possível observar que as ME produzidas com argilas orgânicas possuem uma superfície morfologicamente semelhante às ME produzidas com

MMT, de aspeto rugoso e, com alguns aglomerados de argila não dispersa. Mais uma vez se verifica que as ME não são porosas.

### 4.3. Grau de Inchamento (swelling)

O grau de inchamento das ME de QS e QS/argila (sem adição de princípio ativo), reticuladas ionicamente numa solução de TPF, foi avaliado utilizando uma solução de PBS (pH=7,4), os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 48 e 49. A pH 1.2, devido à elevada solubilidade do QS e ao baixo grau de reticulação das ME de QS/argila, os estudos de inchamento das ME foram impossíveis de realizar porque se observou uma acelerada desintegração das mesmas. O que impediu a pesagem e determinação da massa total das ME ao longo do tempo.

Os dois principais fatores que permitem o controlo do grau de inchamento são a hidrofobicidade e o grau de reticulação das ME produzidas. Por sua vez, o grau de inchamento, será um dos principais fatores no controlo do perfil de libertação de fármaco *in vitro*.

Nas Figuras 48 e 49, encontram-se os resultados obtidos para o grau de inchamento das ME produzidas.

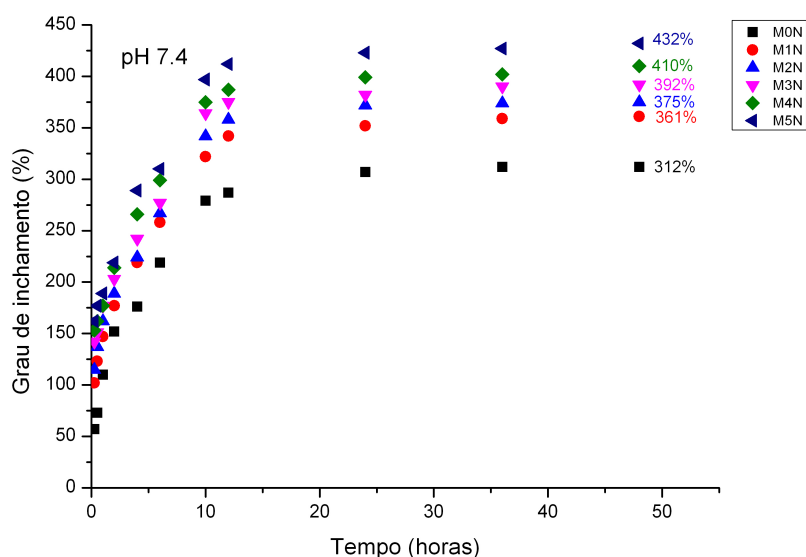


Figura 48- Grau de inchamento em função do tempo das ME de QS/MMT com diferentes % (m/m) de MMT em comparação ao grau de inchamento das ME de QS (M0N)

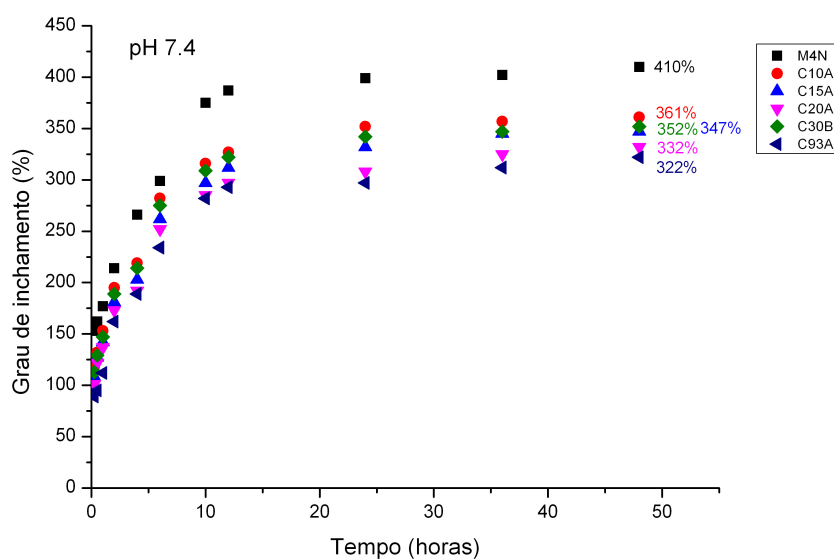


Figura 49- Grau de inchamento em função do tempo das microesferas de QS/argila quimicamente modificada em comparação ao grau de inchamento das ME de QS/MMT produzidas com a mesma % (m/m) de argila (M4N).

É possível observar nas Figuras 48 e 49, que todas as ME apresentam um elevado grau de inchamento (>300%) apresentando este um valor estável após 48h. O elevado grau de inchamento, observado na Figura 48, para as ME de QS (M0N) deve-se principalmente à sua baixa hidrofobicidade, o que possibilita a penetração de PBS na matriz do sistema. Nas ME de QS/MMT observa-se, na Figura 48, e contrariamente ao esperado, que o aumento da % (m/m)

de argila utilizada aquando a produção das ME promoveu o aumento do grau de inchamento. Este fato pode dever-se à diminuição do grau de reticulação das esferas consequência da presença de elevadas concentrações de argila de difícil dispersão e diminuição do número de grupos amina disponíveis, por parte do QS, para estabelecer ligações com o agente reticulante (TPF). Nas ME de QS/argila quimicamente modificada observou-se, para uma mesma  $\%(m/m)$  de argila utilizada, Figura 49, uma diminuição no grau de inchamento comparativamente às esferas QS/MMT (M4N). Este fato está relacionado com a hidrofobicidade destas argilas em oposição à hidrofiliabilidade da MMT. O aumento deste valor em relação a M0N, que apresentou um valor máximo de grau de inchamento de 312%, vem novamente mostrar que o grau de inchamento das ME está relacionado com o aumento da  $\%(m/m)$  de argila utilizada e a consequente diminuição do grau de reticulação.

#### **4.4. Eficácia de Encapsulação de Fármaco (EE) e Perfil de Liberação Controlada de Fármaco *in vitro* (Drug Release) das microesferas de quitosano/argila/ácido acetilsalicílico**

##### **4.4.1. Eficácia de Encapsulação de Fármaco (EE)**

Com o intuito de medir a eficácia de encapsulação das ME produzidas quantificou-se a massa de fármaco deixada por cada uma delas na solução reticulante, aquando da reticulação. Subtraiu-se esse valor ao total de fármaco colocado nas amostras e obtiveram-se assim os valores de EE apresentados na Figura 50.

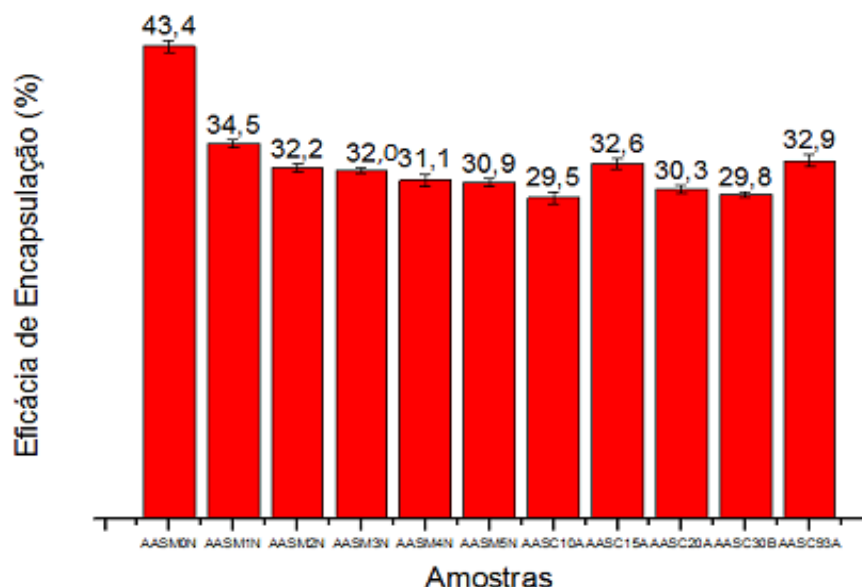


Figura 50-Eficácia de encapsulação das ME de QS, QS/MMT e QS/argilas quimicamente modificadas.

Neste contexto, é importante entender qual a natureza do tipo de ligações existentes entre o AAS e os restantes componentes do sistema (QS e argila). O AAS apresenta carácter hidrofílico e interage com o QS (também hidrofílico) através de: **(i)** interações electrostáticas entre os grupos amina do QS e os grupos carboxilo do AAS, sendo esta a ligação predominante; **(ii)** pontes de hidrogénio entre o grupo carboxilo do AAS e o -OH do QS e; **(iii)** pontes de hidrogénio entre o -H do QS e o -OH do grupo carboxilo do AAS [68]. Quanto à interação entre o fármaco e a argila, sabe-se que os filossilicatos promovem a troca catiónica e, portanto, podem ligar-se a fármacos catiónicos via interação eletrostática [2, 45]. No presente estudo, e sendo o fármaco disponível no laboratório de acolhimento, utilizou-se o AAS. O AAS não é um fármaco catiónico e, vai interagir com a argila através de pontes de hidrogénio entre o grupo carboxilo e os grupos hidroxilo da argila [41].

No presente estudo, tendo em conta que o fármaco utilizado não era catiónico, não se promovendo a troca catiónica com a argila, a ligação predominante entre o AAS e o sistema acontece através de interações electrostáticas entre os grupos amina do QS e os grupos carboxilo do AAS. As ME produzidas com argila apresentam uma diminuição da EE, relativamente às ME apenas de QS (AASMON), provavelmente devido à presença de quantidades elevadas de argila que, apesar de promoverem ligações entre os seus grupos hidroxilo e os iões carboxilo do AAS, dificultaram a ligação entre o AAS e o QS. Conclui-se assim que, quando o teor de argila é demasiado grande, a dificuldade de dispersão da argila,

principalmente das argilas quimicamente modificadas e hidrofóbicas, diminui a capacidade de reticulação e provoca uma diminuição na EE de AAS. Relativamente às ME produzidas utilizando as argilas quimicamente modificadas (AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30A, AASC93A) não foi visível uma grande variação da EE entre elas. Para possibilitar uma melhor compreensão deste comportamento teria que ser efetuado um estudo mais intensivo relativamente aos diferentes surfatantes utilizados e às possíveis ligações entre o AAS e as diferentes argilas orgânicas. Era esperado, na presença de uma droga catiónica como a ofloxacina, que o aumento da concentração de argila nas amostras aumentasse significativamente a EE [66].

#### 4.4.2. Perfil de Libertação Controlada de Fármaco *in vitro* (Drug Release)

Neste subcapítulo foi estudado o perfil de libertação *in vitro* dos vários sistemas de libertação controlada de fármacos produzidos, ou seja, estudou-se a influência da concentração e tipo de argila utilizados, no perfil de libertação. Para tal e, como foi referido em 3.4.2 as ME foram colocados em dois meios aquosos distintos de pH 1.2 e pH 7.4 (PBS e SGF respetivamente), à temperatura ambiente. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 51, 52, 53 e 54.

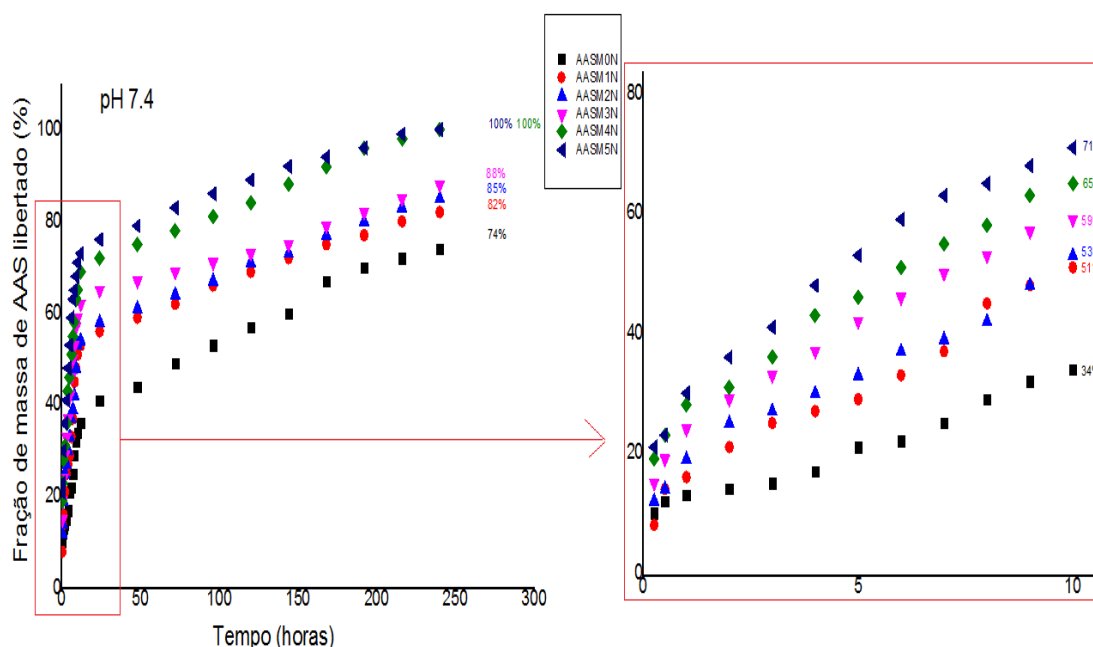


Figura 51-Perfil de libertação *in vitro* do AAS, em PBS (pH 7.4), a partir de ME de QS e QS/MMT preparadas com diferentes %(m/m) de MMT.

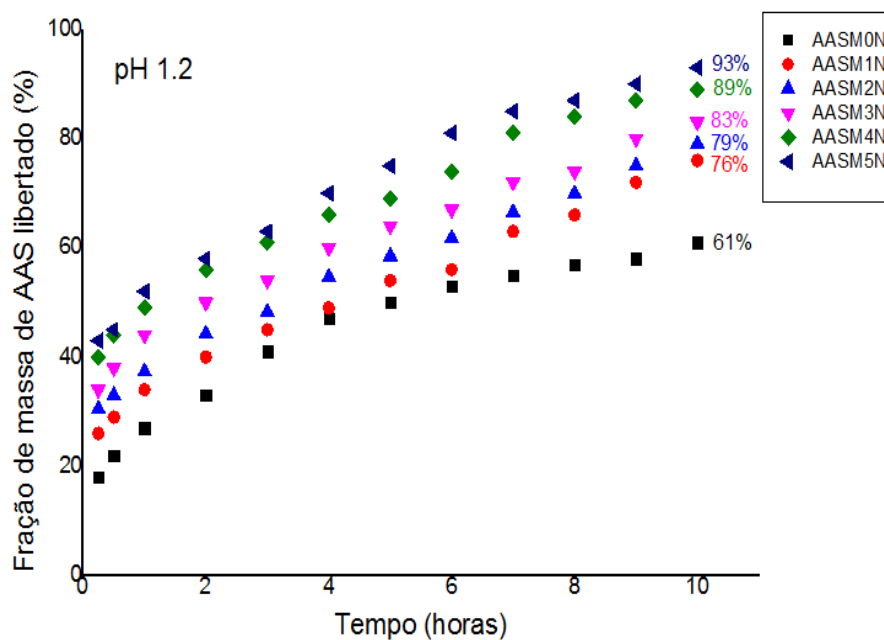


Figura 52- Perfil de liberação *in vitro* do AAS, em SGF (pH 1.2), a partir de ME de QS e QS/MMT preparadas com diferentes %(m/m) de MMT.

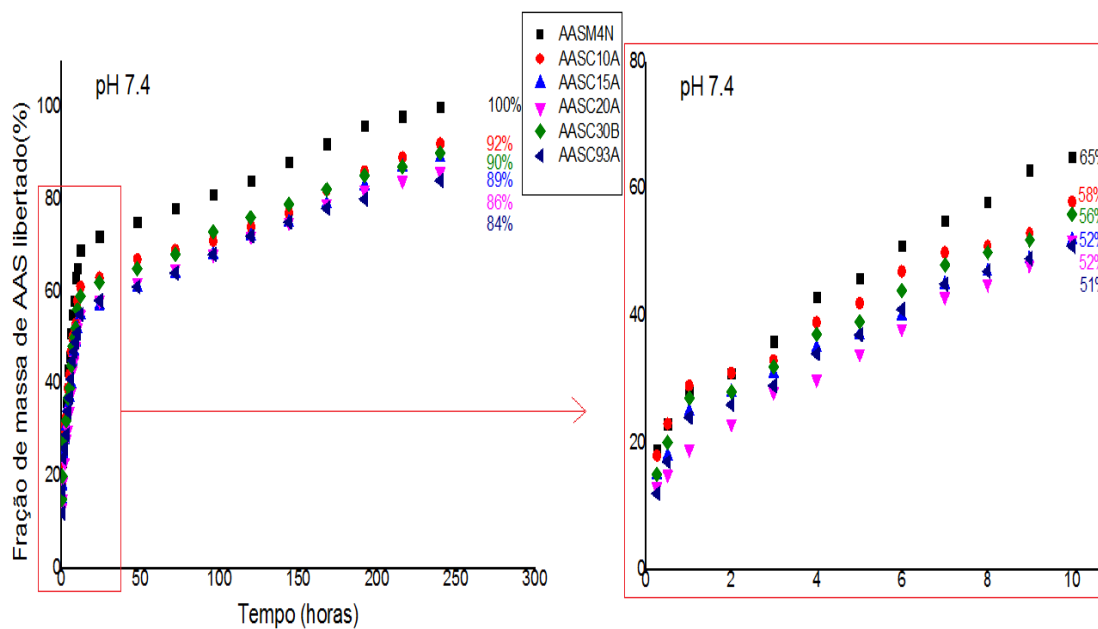


Figura 53- Perfil de liberação *in vitro* do AAS, em PBS (pH 7.4), a partir das ME AASM4N e de ME de QS/argila quimicamente modificada.



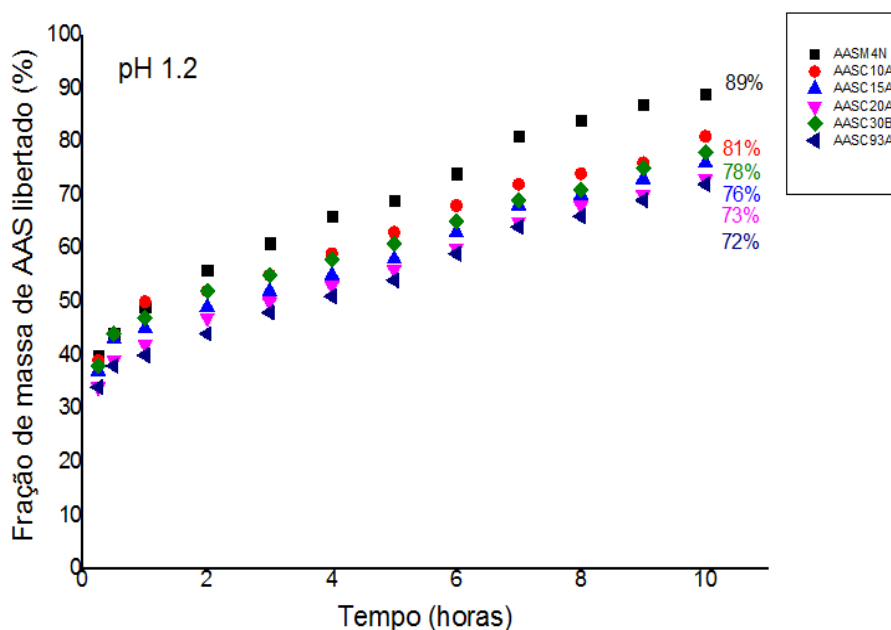


Figura 54- Perfil de liberação *in vitro* do AAS, em SGF (pH 1.2), a partir das ME AASM4N e de ME de QS/argila quimicamente modificada.

Através da observação das Figuras 51, 52, 53 e 54 verifica-se que a adição de argila e o aumento da sua % (m/m) relativamente ao QS promove uma liberação de fármaco mais rápida em ambos os meios, estando estes resultados em concordância com os obtidos para o grau de inchamento das ME. Verifica-se ainda que o perfil de liberação do AAS em PBS (Figuras 51 e 53) se caracteriza por uma rápida liberação inicial (*burst release*) na qual uma grande percentagem do fármaco, que se encontra na superfície das ME, é libertado após o primeiro dia. A porção de fármaco que não se encontra à superfície liberta-se posteriormente mais lentamente ou seja de forma controlada, sendo esta fase influenciada pelo inchamento, pela erosão e/ou degradação do polímero e, pela consequente quebra das pontes de hidrogénio formadas entre o AAS e, o QS e a argila.

Relativamente às ME produzidas com MMT, a fração de massa de AAS libertada aumentou, em ambos os meios, na seguinte ordem: AASM0N, AASM1N, AASM2N, AASM3N, AASM4N e AASM5N. Em pH 7.4 (PBS), no qual o QS é insolúvel, não se observa nem nas ME de QS (AASM0N) nem nas ME de QS/MMT qualquer desintegração mesmo após 10 dias. Após este período apenas as amostras AASM4N e AASM5N libertaram todo o fármaco encapsulado, como pode ser observado na Figura 51. Desta forma, comprova-se a aplicabilidade das ME de QS e de QS/MMT em sistemas de liberação controlada a longo prazo (ex: sistema de liberação controlada de fármacos implantável). Em pH ácido (SGF pH 1.2), no qual o QS é solúvel, foi observada a desintegração das ME, de QS (AASM0N) e de QS/MMT, possivelmente



devido à quebra da reticulação entre o QS e o TPFF [66]. A desintegração das ME e a consequente liberação de fármaco foram aceleradas pela diminuição do grau de reticulação promovido pelo aumento da  $\%(m/m)$  de argila utilizada na produção das ME, como pode ser observado na Figura 52.

Por sua vez, nas ME produzidas com argilas quimicamente modificadas (Figuras 53 e 54) (AASC10A, AASC15A, AASC20A, AASC30B e AASC93A), para uma mesma  $\%(m/m)$  de argila, a liberação foi um pouco mais lenta do que a observada para as ME produzidas com MMT (AASM4N), este fato pode prender-se ao carácter hidrofóbico destas argilas que, diminui a taxa de inchamento das ME e consequentemente a taxa de liberação de fármaco [5, 54]. Observou-se alguma desintegração destas ME, contudo não tão evidente como nas ME de QS/MMT. Verificou-se que o tipo de surfatante utilizado na modificação química das argilas parece não ter grande influência nos perfis de liberação das amostras visto que estes se apresentam muito semelhantes.

É ainda importante referir que, em todas as ME preparadas a liberação foi mais rápida em pH 1.2 que em pH 7.4 Uma possível explicação para o ocorrido prende-se com o fato de em pH 1.2, devido à fraca reticulação do QS, ocorrer a desintegração das ME, provocando esta maior liberação.

Por fim, calculou-se o expoente difusional das diferentes amostras, de acordo com a equação empírica proposta por Ritger e Peppas (Equação 5), como descrito no Anexo C, tendo-se obtido os valores presentes na Tabela 19 [78].

Tabela 19- Valores do expoente difusional (n) e tipo de liberação de fármaco obtidos para os sistemas de ME produzidos.

Amostra	pH 7.4 (SGF)		pH 1.2 (PBS)	
	Expoente difusional (n)	Tipo de liberação	Expoente difusional (n)	Tipo de liberação
<b>AASM0N</b>	0,306±0,019≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,343±0,009≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASM1N</b>	0,406±0,028≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,247±0,011≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASM2N</b>	0,382±0,016≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,219±0,017≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASM3N</b>	0,368±0,013≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,199±0,009≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASM4N</b>	0,317±0,019≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,170±0,00815≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASM5N</b>	0,326±0,021≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,150±0,020≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASC10A</b>	0,297±0,016≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,139±0,012≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASC15A</b>	0,318±0,013≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,137±0,009≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASC20A</b>	0,373±0,018≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,166±0,008≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASC30B</b>	0,339±0,015≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,148±0,007≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana
<b>AASC93A</b>	0,359±0,016≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana	0,155±0,008≤0,5	Tendência para a liberação Fickiana

De acordo com os valores do expoente difusional obtidos (Tabela 19) verifica-se que: **(i)** em pH 7.4 as ME apresentam uma tendência para a liberação Fickiana na qual o mecanismo de difusão é controlado pelo gradiente de concentração, o que está de acordo com a rápida liberação superficial inicial; **(ii)** em pH 1.2, apesar de macroscopicamente ser visível a desintegração das ME, pensa-se que a liberação nos fragmentos das mesmas continua a acontecer e apresenta uma tendência Fickiana. Ou seja, apesar de a liberação ser mais rápida, o mecanismo de difusão é também controlado pelo gradiente de concentração [78,79].

## 4.5. Testes de Citotoxicidade

Nesta etapa foram efetuados testes de citotoxicidade dos sistemas produzidos. Para tal o método adotado foi o método indireto como foi descrito em 3.5. Nas Figuras 55, 56, 57, 58, 59 e 60 encontram-se os resultados de absorvância obtidos para os sistemas testados.

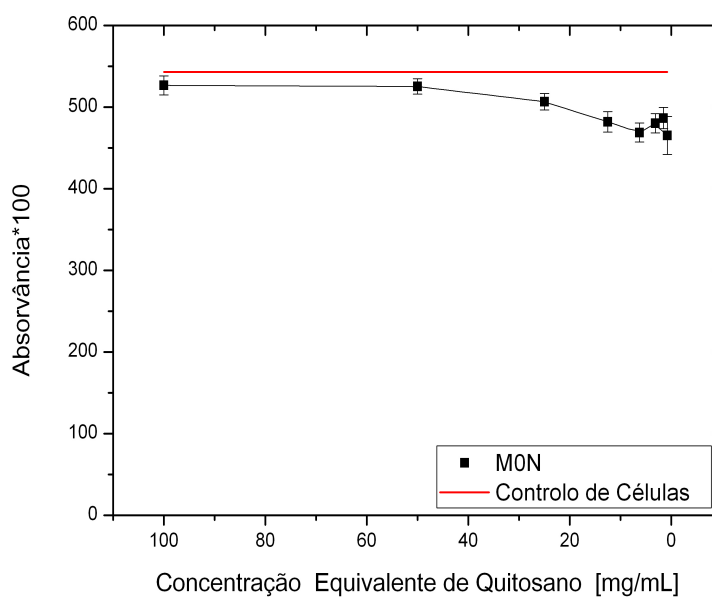


Figura 55- Absorvância obtida para a amostra MON em função da concentração equivalente de QS presente no extrato da mesma.

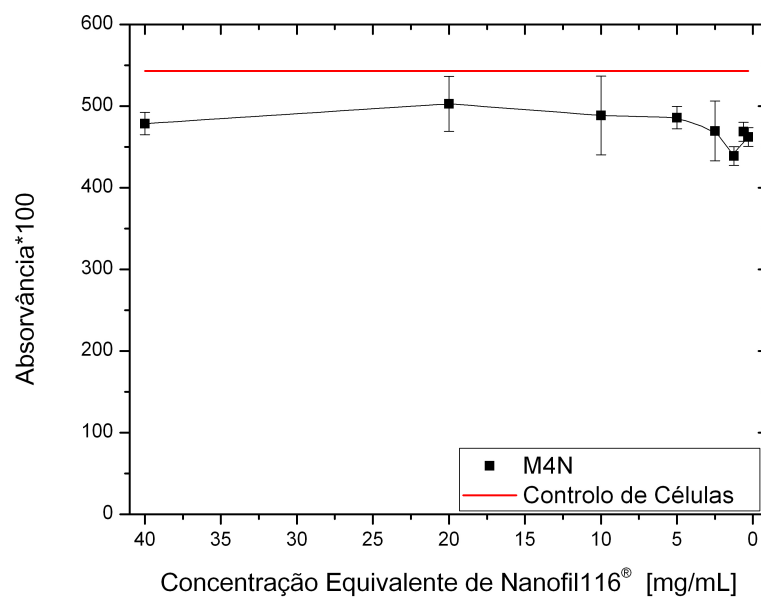


Figura 56- Absorvância obtida para a amostra M4N em função da concentração equivalente de Nanofil116® presente no extrato da mesma.

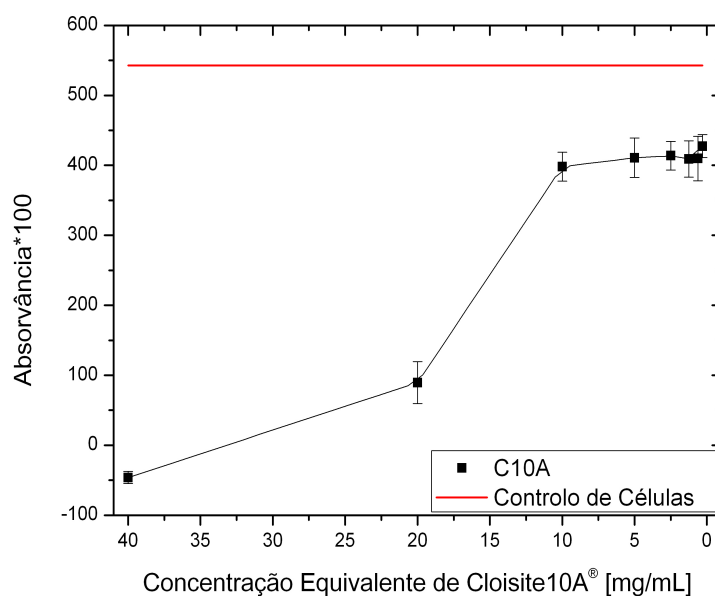


Figura 57- Asorvância obtida para a amostra C10A em função da concentração equivalente de Cloisite10A® presente no extrato da mesma.

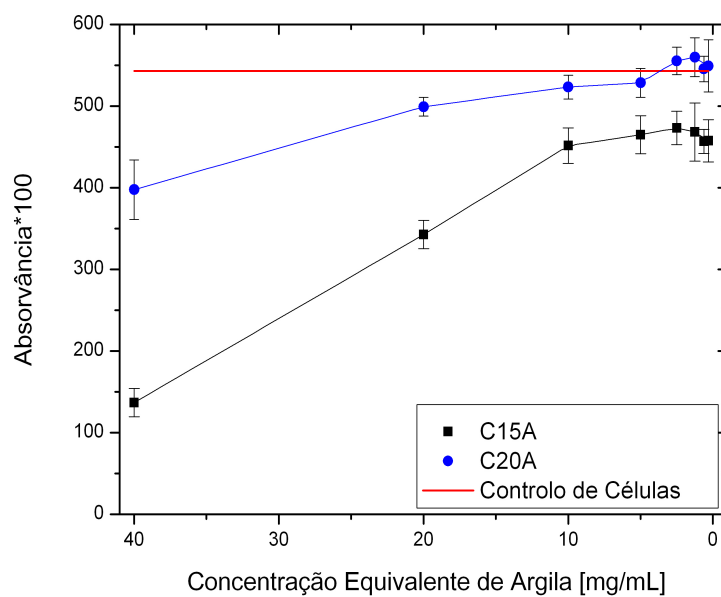


Figura 58- Absorvância obtida para as amostras C15A e C20A em função da concentração equivalente de Cloisite15A® e de Cloisite20A®, respectivamente, presente nos extratos das mesmas.

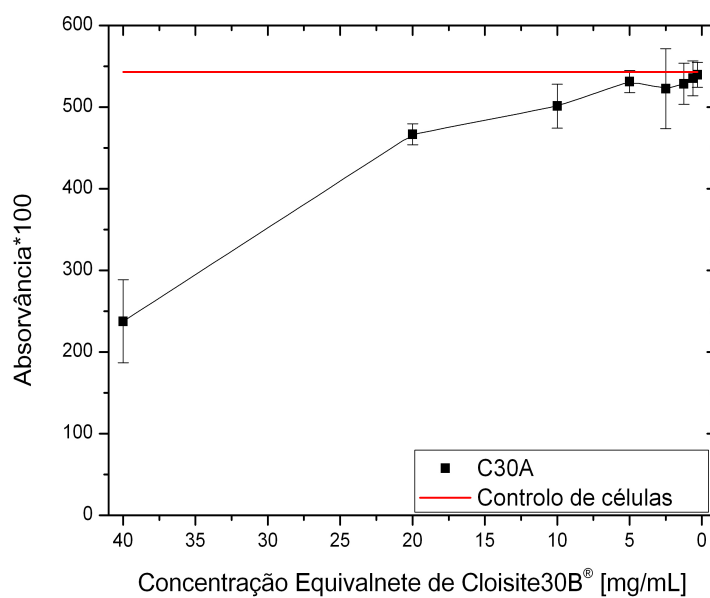


Figura 59- Absorvância obtida para a amostra C30B em função da concentração equivalente de Cloisite30B® presente no extrato da mesma.

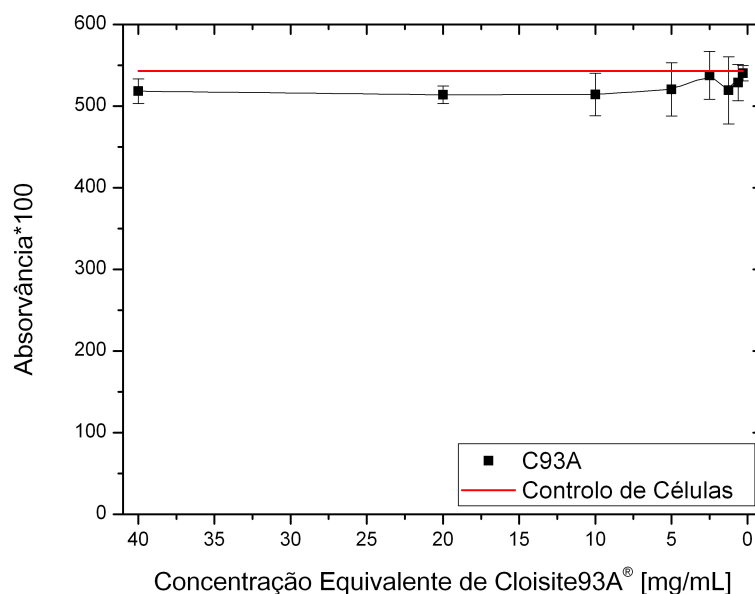


Figura 60- Absorvância obtida para a amostra C93A em função da concentração equivalente de Cloisite93A® presente no extrato da mesma.

Como pode ser observado nas Figuras 55, 56, 57, 58, 59 e 60, em algumas amostras desde o momento inicial e noutras a partir de uma concentração específica, é visível a aproximação a um patamar estável indicativo de não citotoxicidade. Com o intuito de determinar a citotoxicidade dos sistemas de ME, foi feita uma média dos valores obtidos no patamar de não citotóxicidade para cada um deles. Uma amostra que apresente um valor de absorvância: (i) >90% do valor médio do patamar é considerada não citotóxica (NC); (ii) entre 80 e 90% do valor médio do patamar é considerada levemente citotóxica (LC); (iii) entre 50 a 79% do valor médio do patamar é considerada moderadamente citotóxica (MC); e (iv) <50% do valor médio do patamar é considerada severamente citotóxica (SC). Os resultados obtidos para as ME estudadas encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20- Resultados de citotoxicidade obtidos para as diferentes concentrações equivalentes dos extratos de microesferas testados (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 representam as concentrações totais do extrato de acordo com a Tabela 14). Os resultados são apresentados de acordo com o seguinte código de cores: verde- não citotóxico; amarelo- levemente citotóxico; laranja- moderadamente citotóxico; vermelho- severamente citotóxico.

	Citotoxicidade das amostras						
	M0N	M4N	C10A	C15A	C20A	C30B	C93A
<b>C1</b>	NC	NC	SC	SC	MC	SC	NC
<b>C2</b>	NC	NC	SC	MC	NC	LC	NC
<b>C3</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>C4</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>C5</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>C6</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>C7</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>C8</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Verificou-se que as ME de QS (M0N) não apresentavam citotoxicidade. Desta forma os resultados obtidos para as ME de QS/argila foram apenas relacionados com as concentrações de argila existentes nos extratos.

Pela análise da Tabela 20 verifica-se a não citotoxicidade do QS e das argilas utilizadas, pelo menos abaixo, e inclusive, de uma concentração equivalente de argila de 10mg/mL. Conclui-se ainda que a baixa viabilidade celular apresentada pelas amostras C10A, C15A, C20A e C30A para os extratos de maior concentração de argila resulta da presença de surfatantes nas argilas orgânicas. Isto porque a MMT não apresentou qualquer citotoxicidade. Este resultado é ainda

reforçado pela maior citotoxicidade verificada na amostra C15A comparativamente à amostra C20A. A argila orgânica Cloisite15A® possui uma maior quantidade de um mesmo surfatante que a argila Cloisite20A®.

Nas figuras seguintes é apresentado, a termo de exemplo, o aspeto das culturas celulares após o contato com o extrato de concentração C1 das amostras M0N (Figura 61) e C93A (Figura 62).

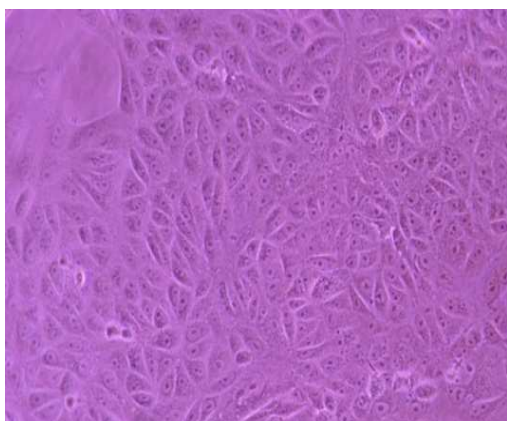


Figura 61- Fotografia de Cultura Celular após contato com extrato (concentração equivalente de QS de 100mg/mL) de M0N.

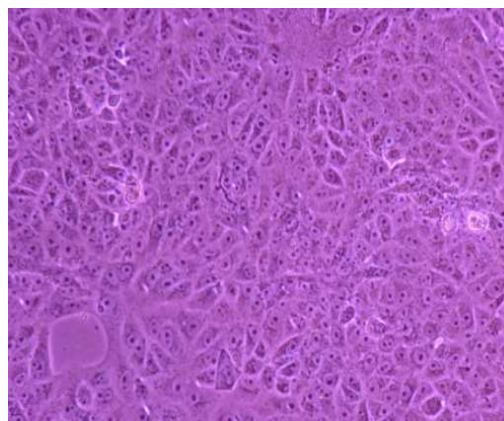


Figura 62- Fotografia de Cultura Celular após contato com extrato (concentração equivalente de Cloisite93A® de 40mg/mL) de C93A.

Verifica-se pela observação das Figuras 60 e 61 que a morfologia das células permanece inalterada e que o número de células viáveis é muito semelhante em ambos os casos.



## 5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Nesta dissertação pretendia produzir-se ME de nanocompósitos de quitosano/argila como sistemas de libertação controlada de fármacos, para aplicação na toma oral ou implantáveis.

Inicialmente, foi efetuada uma caracterização físico-química das ME, tendo-se verificado, com recurso à técnica de FTIR, a presença quer do QS quer da argila nos sistemas produzidos. A obtenção de nanocompósitos não supõe, contudo, apenas a mistura física entre o polímero e a argila (ou qualquer outro agente inorgânico). Para que tal aconteça, é necessário que ocorram a exfoliação ou intercalação da argila, sendo este processo bastante complicado. A técnica escolhida para a produção dos nanocompósitos, devido à sua simplicidade e baixo custo, foi a intercalação em solução. No entanto, como foi observado nos difratogramas obtidos através de DRX, não foi possível promover a exfoliação/intercalação da argila, tendo-se obtido compósitos reforçados por micropartículas (cujas propriedades se encontram na mesma gama dos compósitos tradicionais). Outro fator que pode ter influenciado a dificuldade de intercalação/exfoliação da argila prende-se com a % (m/m) de argila utilizada na formulação das ME. A argila utilizada neste estudo possui uma área superficial muito elevada (nano argila) e, consequentemente, a dispersão de elevadas quantidades é extremamente difícil tal como foi verificado. Após reticulação iónica com TPF foi possível, com recurso à MO e à MEV, observar que as partículas formadas possuíam uma forma esférica de aproximadamente 1  $\mu$ m de diâmetro e, uma superfície rugosa e não porosa.

Posteriormente foram efetuados estudos à aplicabilidade terapêutica das ME produzidas, tendo sido estes resultados condicionados por dois principais fatores:

- (i) a adição de % (m/m) de argila elevadas que dificultou, como já foi referido, a sua dispersão (não se obtendo nanocompósitos) e provocou a diminuição do grau de reticulação das ME devido à diminuição do número de grupos amina disponíveis, por parte do QS, para estabelecer ligações com o TPF;
- (ii) a utilização de um fármaco não catiónico (AAS) não promoveu a troca catiónica com a argila e, consequentemente não promoveu a sua intercalação nas galerias da mesma.

Nas amostras estudadas a ligação predominante entre o AAS e o sistema acontece através de interações electrostáticas entre os grupos amina do QS e os grupos carboxilo do AAS.

Desta forma, com a adição e aumento da %(m/m) de argila, foi observada uma diminuição da eficácia de encapsulação, um aumento do grau de inchamento e consequentemente um aumento da taxa de libertação de fármaco em ambos os meios estudados (pH 1.2 e pH 7.4), comparativamente às ME de QS (M0N e AASM0N). A elevada desintegração e consequente elevada taxa de libertação verificadas pelas ME em pH ácido, que pretendia mimetizar o ambiente gástrico, não se verificou em pH 7.4. Em PBS (pH 7.4) não foi observada qualquer desintegração das ME, mesmo após 10 dias, sendo que após este período a maioria das ME ainda não tinha libertado todo o fármaco encapsulado. Estes resultados apoiam a aplicabilidade das ME em sistemas de libertação prolongada implantáveis, tais como o preenchimento de lacunas ósseas, aquando da fratura.

Por fim, tendo em consideração a aplicação biomédica dos sistemas produzidos, foram realizados testes de citotoxicidade nos quais, se comprovou a não citotoxicidade do QS e das argilas utilizadas, pelo menos abaixo de uma concentração equivalente de 10mg/mL. Comprovou-se ainda que a baixa viabilidade celular apresentada pelas amostras C10A, C15A, C20A e C30A para concentrações de argila superiores a 10mg/mL resulta da presença de surfatantes nas argilas orgânicas, uma vez que a MMT não apresentou qualquer citotoxicidade. Em suma, concluiu-se que é viável a aplicação destes sistemas a dispositivos médicos, tais como sistemas de libertação controlada de fármacos.

Considerando a necessidade crescente de sistemas de libertação controlada de fármacos e a potencialidade dos nanocompósitos de QS/argila nessa área. Como perspetivas futuras, com o intuito de melhorar os resultados obtidos e, produzir ME de nanocompósitos de QS/argila com propriedades melhoradas capazes, de ultrapassar o ambiente gástrico e promover uma libertação ao nível intestinal/colon ou, de uma libertação mais prolongada, em sistemas implantáveis, tem-se:

- A melhoria da técnica utilizada: **(i)** aumentando o tempo de ‘expansão’ da argila (aproximadamente 24 horas) em ácido acético, antes da adição do AAS e do QS, de forma a promover o ‘inchamento’ da argila e o aumento do espaçamento basal; e **(ii)**

umentando o tempo de sonicação das amostras em estudo promovendo uma melhor dispersão da argila.

- A utilização de  $\%(m/m)$  de argila significativamente mais pequenas, promovendo desta forma a sua completa e homogênea dispersão. Neste contexto, e tendo em consideração que a fração em peso do aditivo inorgânico, necessária à obtenção de nanocompósitos com propriedades melhoradas relativamente aos compósitos tradicionais é tipicamente inferior a 10%, pensa-se que a utilização de  $\%(m/m)$  de 3, 5, 7 e 10 % de argila relativamente ao total de QS seriam suficientes.
- A utilização de um fármaco catiónico que, permitisse a ligação à argila através de troca catiónica, promovendo assim a intercalação do mesmo nas galerias da argila o que, dificultaria e prolongaria a sua libertação no organismo.
- O estudo exato do período de trânsito gastrointestinal (período de permanência em ambiente gástrico e em ambiente intestinal). Desta forma, o perfil de libertação seria efetuado colocando as ME primeiro em SGF (durante um determinado período de tempo) sendo depois transferidas para SIF, mimetizando assim o melhor possível a toma oral.
- A produção de *scaffolds*, utilizando as ME, e o estudo das propriedades mecânicas dos mesmos seria também de relevada importância uma vez que, permitiria a verificação da sua aplicabilidade como implantes ósseos multifacetados (promotores de suporte, regeneração e terapêutica).



## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] A. K. Gaharwar, S. M. Mihaila, A. Swami, A. Patel, S. Sant, R. L. Reis, *et al.*, "Bioactive Silicate Nanoplatelets for Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells," *Advanced Materials*, vol. 25, pp. 3329-3336, Jun 25 2013.
- [2] Q. Yuan, J. Shah, S. Hein, and R. D. K. Misra, "Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier," *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 1140-1148, Mar 2010.
- [3] D. Depan, A. P. Kumar, and R. P. Singh, "Cell proliferation and controlled drug release studies of nanohybrids based on chitosan-g-lactic acid and montmorillonite," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, pp. 93-100, Jan 2009.
- [4] K. H. Liu, T. Y. Liu, S. Y. Chen, and D. M. Liu, "Drug release behavior of chitosan-montmorillonite nanocomposite hydrogels following electro stimulation," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, pp. 1038-1045, Jul 2008.
- [5] D. Sahoo and P. L. Nayak, "Synthesis and characterization of chitosan/cloisite 30B film for controlled release of ofloxacin," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 123, pp. 2588-2594, Mar 5 2012.
- [6] G. V. Joshi, B. D. Kevadiya, H. M. Mody, and H. C. Bajaj, "Confinement and controlled release of quinine on chitosan-montmorillonite bionanocomposites," *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, vol. 50, pp. 423-430, Feb 1 2012.
- [7] R. M. Mainardes and L. P. Silva, "Drug delivery systems: Past, present, and future," *Current Drug Targets*, vol. 5, pp. 449-455, Jul 2004.
- [8] J. F. Coelho, P. C. Ferreira, P. Alves, R. Cordeiro, A. C. Fonseca, J. R. Góis, M. H. Gil; "Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments"; ed. European Association for Predictive; Preventive and Personalised Medicine; 2010.
- [9] R. Langer, N. A. Peppas; "Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology"; ed. AIChE Journal; Volume 49, Issue 12; pages 2990-3006, 2003.
- [10] U. Edlund, A. C. Albertsson; "Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery," ed. Degradable Aliphatic Polyesters                      Advances in Polymer Science Volume 157, pp 67-112, 2002.
- [11] R. J. M. Kinam Park and "Controlled Drug Delivery: Present and Future," ed. Controlled Drug Delivery; Chapter 1, pp 2–12 ACS Symposium Series, Vol. 752, 2000.
- [12] K. Kim, D. W. Pack; "MICROSPHERES FOR DRUG DELIVERY," ed. BioMEMS and Biomedical Nanotechnology; Volume 1: Biological and biomedical nanotechnology; Chapter 2, 2006.

- [13] M. L. Tan, P. F. M. Choong, C. R. Dass, "Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery," *Peptides*, vol. 31, pp. 184-193, Jan 2010.
- [14] N. K. SACHAN, B. Singh, K. R. Rao; "CONTROLLED DRUG DELIVERY THROUGH MICROENCAPSULATION," ed. Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 4, No. 1, 65–81, 2006.
- [15] N.V. Satheesh Madhav, S. Kala; "Review on Microparticulate Drug Delivery System," ed. International Journal of PharmTech Research CODEN (USA): IJPRIF ISSN : 0974-4304 Vol.3, No.3, pp 1242-1254, 2011.
- [16] M. N. Singh, K. S. Y. Hemant, M. Ram, H. G. Shivakumar, "Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery," *Research in pharmaceutical sciences*, vol. 5, pp. 65-77, 2010-Jul 2010.
- [17] S. S. Catherine Tomaro-Duchesneau, Meenakshi Malhotra, Imen Kahouli, and Satya Prakash, "Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions," ed. Journal of Pharmaceutics Volume 2013 (2013), Article ID 103527, 19 pages, 2013.
- [18] V. R. Sinha, A. K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, *et al.*, "Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 274, pp. 1-33, Apr 2004.
- [19] S. Dreve, I. Kacso, A. Popa, O. Raita, F. Dragan, A. Bende, *et al.*, "Structural investigation of chitosan-based microspheres with some anti-inflammatory drugs," *Journal of Molecular Structure*, vol. 997, pp. 78-86, Jun 28 2011.
- [20] W. B. I. T. Scheper, Endo, O. Enfors, Fiechter, Hoare, Hu B, Mattiasson, Nielsen, Sahm, Schügerl, Stephanopoulou, von Stockar, T. Tsao, Wandrey, J. Zhong; "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology " vol. Tissue Engineering I; Scaffold Systems for Tissue Engineering ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [21] J. J. Wang, Z. W. Zeng, R. Z. Xiao, T. A. Xie, G. L. Zhou, X. R. Zhan, *et al.*, "Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 6, pp. 765-774, 2011.
- [22] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, and E. Chiellini, "Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 36, pp. 981-1014, Aug 2011.
- [23] M. Kumar, "A review of chitin and chitosan applications," *Reactive & Functional Polymers*, vol. 46, pp. 1-27, Nov 2000.
- [24] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 31, pp. 603-632, Jul 2006.
- [25] C. K. S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma, "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation," *Progress in Polymer Science*, vol. 34, pp. 641-678, Jul 2009.

- [26] M. S. Alberto Di Martino, Makarand V. Risbud, "Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering," ed. *Biomaterials*, Volume 26, Issue 30, Pages 5983–5990, 2005.
- [27] C. T. L. Lakshmi, S. Nair; "Biodegradable polymers as biomaterials," ed. *Progress in Polymer Science*, Volume 32, Issues 8–9, Pages 762–798, 2007.
- [28] H. R. Raphaël Riva, Anne des Rieux, Nicolas Duhem, Christine Jérôme, Véronique Préat, "Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering," ed. *Chitosan for Biomaterials II, Advances in Polymer Science Volume 244*, pp 19-44 2011.
- [29] P. K. S. Vipin Bansal, Nitin Sharma, Om Prakash Pal and Rishabha Malviya, "Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery," ed. *Advances in Biological Research 5 (1)*: 28-37: IDOSI Publications, 2011.
- [30] A. T. Tapan Kumar Giri, Amit Alexander, Ajazuddin, Hemant Badwaik, Dulal Krishna Tripathi, "Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications ", ed. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Volume 2, Issue 5, October 2012, Pages 439–449, 2012.
- [31] N. Bhattarai, J. Gunn, and M. Zhang, "Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, pp. 83-99, Jan 31 2010.
- [32] F. Bergaya, B. K. G. Theng, and G. Lagaly, eds, "Handbook of Clay Science. Developments in Clay Science Series Volume 1," ed, 2006.
- [33] É. Teixeira-Neto, "Modificação química de argilas: desafios científicos e Tecnológicos para obtenção de novos produtos com Maior valor agregado," Â. A. Teixeira-neto, Ed., ed. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 809-817, 2009, 2009
- [34] S. Pavlidou and C. D. Papaspyrides, "A review on polymer-layered silicate nanocomposites," *Progress in Polymer Science*, vol. 33, pp. 1119-1198, Dec 2008.
- [35] P. Kiliaris and C. D. Papaspyrides, "Polymer/layered silicate (clay) nanocomposites: An overview of flame retardancy," *Progress in Polymer Science*, vol. 35, pp. 902-958, Jul 2010.
- [36] M. Alexandre and P. Dubois, "Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials," *Materials Science & Engineering R-Reports*, vol. 28, pp. 1-63, Jun 15 2000.
- [37] F. Gao, "Clay/polymer composites: the story," vol. Volume 7, Issue 11, ed, 2004, pp. 50–55.
- [38] W. Xie, Z. M. Gao, W. P. Pan, D. Hunter, A. Singh, and R. Vaia, "Thermal degradation chemistry of alkyl quaternary ammonium montmorillonite," *Chemistry of Materials*, vol. 13, pp. 2979-2990, Sep 2001.
- [39] P. F. Luckham and S. Rossi, "The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 82, pp. 43-92, Oct 10 1999.
- [40] D. R. Paul, "Polymer nanotechnology: Nanocomposites," vol. Volume 49, Issue 15, L. M. Robeson, Ed., ed. *Polymer*, 2008, pp. 3187–3204.

- [41] J. P. Z. Shu Wei Xu, Lei Tong, Kang De Yao, "Interaction of Functional Groups of Gelatin and Montmorillonite in Nanocomposite ", ed. Wiley InterScience, 2005.
- [42] H. Khalil, D. Mahajan, and M. Rafailovich, "Polymer-montmorillonite clay nanocomposites. Part 1: Complexation of montmorillonite clay with a vinyl monomer," *Polymer International*, vol. 54, pp. 423-427, Feb 2005.
- [43] S. S. Ray and M. Okamoto, "Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing," *Progress in Polymer Science*, vol. 28, pp. 1539-1641, Nov 2003.
- [44] S. S. Ray and M. Bousmina, "Biodegradable polymers and their layered silicate nano composites: In greening the 21st century materials world," *Progress in Materials Science*, vol. 50, pp. 962-1079, Nov 2005.
- [45] C. Aguzzi, P. Cerezo, C. Viseras, and C. Caramella, "Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations," *Applied Clay Science*, vol. 36, pp. 22-36, Apr 2007.
- [46] J. P. Zheng, L. Luan, H. Y. Wang, L. F. Xi, and K. D. Yao, "Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system," *Applied Clay Science*, vol. 36, pp. 297-301, May 2007.
- [47] G. V. Joshi, B. D. Kevadiya, H. A. Patel, H. C. Bajaj, and R. V. Jasra, "Montmorillonite as a drug delivery system: Intercalation and in vitro release of timolol maleate," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 374, pp. 53-57, Jun 5 2009.
- [48] H. A. P. Ghanshyam V. Joshi, Bhavesh D. Kevadiya, Hari C. Bajaj, "Montmorillonite intercalated with vitamin B1 as drug carrier," ed. *Applied Clay Science* 45 (2009) 248–253, 2009.
- [49] R. Nanda, A. Sasmal, and P. L. Nayak, "Preparation and characterization of chitosan-poly lactide composites blended with Cloisite 30B for control release of the anticancer drug paclitaxel," *Carbohydrate Polymers*, vol. 83, pp. 988-994, Jan 10 2011.
- [50] W. D. CALLISTER Jr, "Materials Science and Engineering," ed. New York: Wiley, 2007.
- [51] S. H. Cypes, W. M. Saltzman, and E. P. Giannelis, "Organosilicate-polymer drug delivery systems: controlled release and enhanced mechanical properties," *Journal of Controlled Release*, vol. 90, pp. 163-169, Jun 24 2003.
- [52] C. J. Wu, A. K. Gaharwar, P. J. Schexnailder, and G. Schmidt, "Development of Biomedical Polymer-Silicate Nanocomposites: A Materials Science Perspective," *Materials*, vol. 3, pp. 2986-3005, May 2010.
- [53] W. F. Lee and Y. C. Chen, "Effect of bentonite on the physical properties and drug-release behavior of poly(AA-co-PEGMEA)/bentonite nanocomposite hydrogels for mucoadhesive," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 91, pp. 2934-2941, Mar 5 2004.
- [54] A. Cojocariu, L. Profire, M. Aflori, and C. Vasile, "In vitro drug release from chitosan/Cloisite 15A hydrogels," *Applied Clay Science*, vol. 57, pp. 1-9, Mar 2012.



- [55] X. Wang, Y. Du, and J. Luo, "Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity," *Nanotechnology*, vol. 19, Feb 13 2008.
- [56] I. Salcedo, C. Aguzzi, G. Sandri, M. C. Bonferoni, M. Mori, P. Cerezo, *et al.*, "In vitro biocompatibility and mucoadhesion of montmorillonite chitosan nanocomposite: A new drug delivery," *Applied Clay Science*, vol. 55, pp. 131-137, Jan 2012.
- [57] H. Zhuang, J. P. Zheng, H. Gao, and K. D. Yao, "In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonite-chitosan intercalated nanocomposite," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 18, pp. 951-957, May 2007.
- [58] C. Paluszkievicza, A. Weselucha-Birczynska, E. Stodolak-Zych, and M. Hasik, "2D IR correlation analysis of chitosan-MMT nanocomposite system," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 60, pp. 185-188, May 2012.
- [59] D. R. K. William B. Liechty, Brandon V. Slaughter, and Nicholas A. Peppas, "Polymers for Drug Delivery Systems," ed. NIHPA Author Manuscripts, 2012.
- [60] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 100, pp. 5-28, Nov 5 2004.
- [61] E. Kilicay, B. Cakmakli, B. Hazer, E. B. Denkbaz, and B. Acikgoz, "Acetylsalicylic Acid Loading and Release Studies of the PMMA-g-Polymeric Oils/Oily Acids Micro and Nanospheres," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 119, pp. 1610-1618, Feb 5 2011.
- [62] (Accessed in 11th July 2013). *Synthesis and Quantitation of Acetylsalicylic Acid (Aspirin)*.  
ONLINE. [http://courses.chem.psu.edu/chem14/Forms/Aug05\\_aspirinlabhandout.pdf](http://courses.chem.psu.edu/chem14/Forms/Aug05_aspirinlabhandout.pdf).
- [63] C. Chen, X. Jiang, Y. V. Kaneti, and A. Yu, "Design and construction of polymerized-glucose coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for delivery of aspirin," *Powder Technology*, vol. 236, pp. 157-163, Feb 2013.
- [64] M. Guslandi, "Gastric toxicity of antiplatelet therapy with low-dose aspirin," *Drugs*, vol. 53, pp. 1-5, Jan 1997.
- [65] J. M. Cervantes-Uc, J. V. Cauich-Rodriguez, H. Vazquez-Torres, L. F. Garfias-Mesias, and D. R. Paul, "Thermal degradation of commercially available organoclays studied by TGA-FTIR," *Thermochimica Acta*, vol. 457, pp. 92-102, Jun 15 2007.
- [66] S. Hua, H. Yang, W. Wang, and A. Wang, "Controlled release of ofloxacin from chitosan-montmorillonite hydrogel," *Applied Clay Science*, vol. 50, pp. 112-117, Sep 2010.
- [67] H. Liu and C. Gao, "Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 20, pp. 613-619, Jul 2009.
- [68] A. Wan, Y. Sun, L. Gao, and H. Li, "Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study," *Carbohydrate Polymers*, vol. 75, pp. 566-574, Feb 24 2009.

- [69] (Accessed in 20th June 2013). *General Principles of Freeze Drying (The Lyophilization Process)*. ONLINE. [http://www.freezedrying.com/freeze\\_drying\\_principles.html](http://www.freezedrying.com/freeze_drying_principles.html).
- [70] T. N. Corporation. (Accessed in 24th June 2013). *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*. ONLINE. <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>.
- [71] Y. Zhao and Z. Chen, "Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Study of Atmospheric Heterogeneous Processes," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 45, pp. 63-91, 2010 2010.
- [72] B. D. Cullity, Stock, S. R., "Elements of X-Ray Diffraction," vol. 3ª edição, ed. New Jersey-USA: Prentice Hall, 2001
- [73] (Accessed in 15th June 2013). "Education in Microscopy and Digital Imaging." ONLINE: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/applications/appsubmissionform.aspx>
- [74] Z. L. W. Weilei Zhou, "Scanning Microscopy for nanotechnology: Techniques and Applications," ed: Springer, 2006.
- [75] (Accessed in 05th July 2013). *Chapter 11 Spectrophotometry*. ONLINE. <ftp://ftp.nmenv.state.nm.us/www/swqb/UOCP/StudyManuals/WWLabStudyGuide/11.pdf>.
- [76] S. Jaya, T.D. Duranceand R. Wang; "Physical Characterization of Drug Loaded Microcapsules and Controlled In Vitro Release Study", ed. Canada: The Open Biomaterials Journal, 2010, 2, 9-17, 2010.
- [77] N. A. Peppas, Philip L. Ritger; "A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices ", ed: Journal of Controlled Release- Volume 5, Issue 1, June 1987, Pages 37–42. Elsevier, 1987.
- [78] N. A. Peppas, "Hydrogels in Medicine and Pharmacy," vol. Volume ii: Polymers, ed: CRC Press, 1987.
- [79] A. B. L. Sizue Ota Rogero, Tamiko Ichikawa Ikeda, Áurea Silveira Cruz, "Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias ", ed: Teste Materials Research, Vol. 6, No. 3, 317-320, 2003.
- [80] X. Wang, Y. Du, J. Luo, B. Lin, and J. F. Kennedy, "Chitosan/organic rectorite nanocomposite films: Structure, characteristic and drug delivery behaviour," *Carbohydrate Polymers*, vol. 69, pp. 41-49, May 1 2007.

## ANEXOS

### A. Especificações dos reagentes utilizados na preparação das soluções aquosas utilizadas nos pontos 3.3. e 3.4.

As especificações e concentrações dos reagentes utilizados na preparação das soluções aquosas utilizadas nos pontos 3.3. e 3.4. encontram-se na tabela seguinte.

	Reagentes	Concentração	Especificações	Fornecedor
<b>Solução aquosa de Hidróxido de Sódio</b>	Hidróxido de Sódio (NaOH)	1mol/L	M=39,99 g/mol	Eka
<b>Solução aquosa de Tripolifosfato de Sódio</b>	Tripolifosfato de Sódio (TPF)	10%(m/m)	M=367,86	Sigma Aldrich
<b>Simulated Gastric Fluid (SGF)</b>	Ácido Clorídrico (HCl)	0,1mol/L	36,5% M=36,46 g/mol	Panreac
<b>Phosphate Buffer Solution/ Simulated Intestinal Fluid (PBS/SIF)</b>	Cloreto de Sódio (NaCl)	0,137 mol/L	M=58,44 g/mol	Panreac
	Cloreto de Potássio (KCl)	0,0027 mol/L	M=74,56 g/mol	Panreac
	Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,0125 mol/L	M=141,96 g/mol	Panreac
	Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,00198 mol/L	M=136,09 g/mol	Panreac

## B. Teste de Citotoxicidade

### Materiais

Materiais	Especificações	Fornecedor
Meio de cultura celular	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM+GlutaMAX™)	Invitrogen
Linha Celular	Vero	-
PBS (- -)	-	Invitrogen
Tripsina	Tryple	Invitrogen
Azul de tripano	Trypan Blue	Invitrogen

### Procedimento Experimental

#### Preparação da cultura celular de células Vero

1. Observou-se ao microscópio ótico invertido a monocamada celular de células da linha Vero, previamente preparada num frasco T25, com o intuito de avaliar a viabilidade celular e a ausência de contaminação (fúngica ou microbiana) ;
2. Removeu-se o meio de cultura e lavou-se a monocamada celular com 5 ml de PBS (sem cálcio ou magnésio);
3. Adicionaram-se 500 µl de tripsina com o intuito de soltar as células da base do frasco através da hidrólise das proteínas celulares responsáveis pela aderência;
4. O recipiente contendo as células foi posteriormente colocado a incubar (incubadora de CO<sub>2</sub>) durante 6 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>;
5. Após retirar as células da estufa, estas foram observadas no microscópio invertido para verificar se as células se soltaram e se encontram em suspensão;
6. Adicionaram-se 2 mL de meio de cultura para inativar a tripsina;
7. A suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 mL e foi centrifugada;
8. Descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 2 mL de meio fresco;

9. Retiraram-se 100 µL para a contagem celular, que foi feita segundo o procedimento descrito no próximo ponto;

### Contagem Celular

1. Da suspensão devidamente homogeneizada retiraram-se 100 µL de células para um microtubo, e adicionaram-se 100 µL (fator de diluição 2x) de azul tripano (corante de exclusão: entra nas células não viáveis-permeabilizáveis);

2. Humedeceu-se uma lamela que foi colocada no hemacitómetro, tendo cada uma das suas câmaras de contagem sido preenchida com 10 µL da amostra;

3. Recorrendo a um microscópio ótico invertido, procedeu-se à contagem do número de células viáveis (esferas brilhantes) e inviáveis (esferas azuis) presentes no campo de contagem, que possui vários quadrados de 1mm de lado para facilitar o processo. Devem contar-se as células viáveis presentes em cada um desses quadrados, sendo posteriormente a concentração de células viáveis calculada segundo a equação:

$$\text{Conc. células viáveis} = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número de quadrados contados}} \times \text{diluição} \times 10000 \left( \frac{\text{células}}{\text{ml}} \right)$$

4. Obteve-se uma concentração de 1100 000 células/mL.

5. Posteriormente cultivaram-se 5000 células por poço, pipetando-se 100 µL da suspensão celular para cada poço, incluindo os controlos de células (CC).

## C. Cálculo dos Expoentes Difusionais

O expoente difusional ( $n$ ) característico do perfil de libertação de fármaco *in vitro* foi determinado de acordo com a equação empírica proposta por Ritger e Peppas (Equação 5). Esta equação é válida apenas para os primeiros 60% do total de fármaco libertado [78]. Para possibilitar a representação gráfica e a consequente determinação do expoente difusional ( $n$ ), foi então necessário reorganizar a Equação 5, logaritmizando-a e, obtendo a seguinte expressão:

$$\ln \left[ \frac{M_t}{M_{\infty}} \right] = \ln(k) + n \ln(t)$$

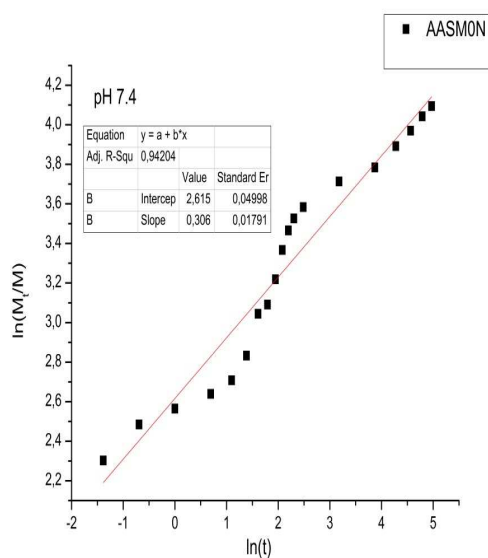


Figura A1- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM0N em pH 7.4.

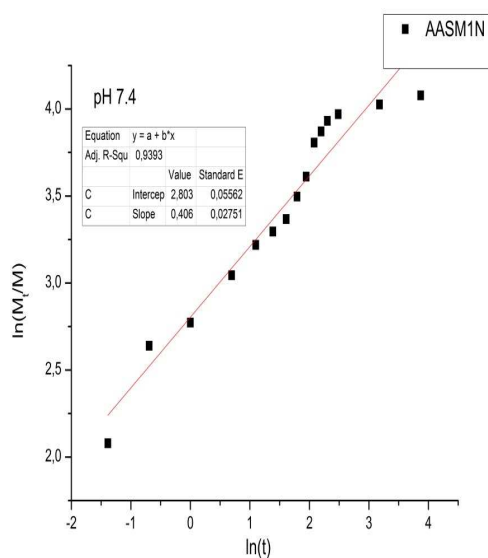


Figura A2- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM1N em pH 7.4.

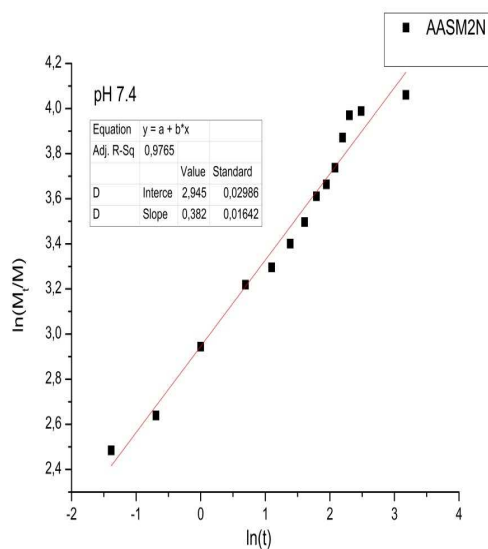


Figura A3- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM2N em pH 7.4.

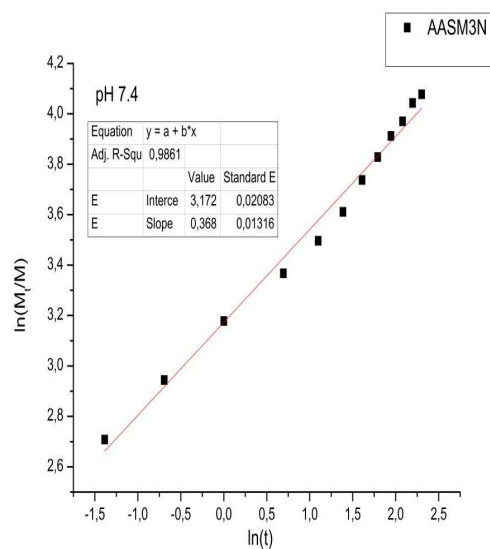


Figura A4- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM3N em pH 7.4.

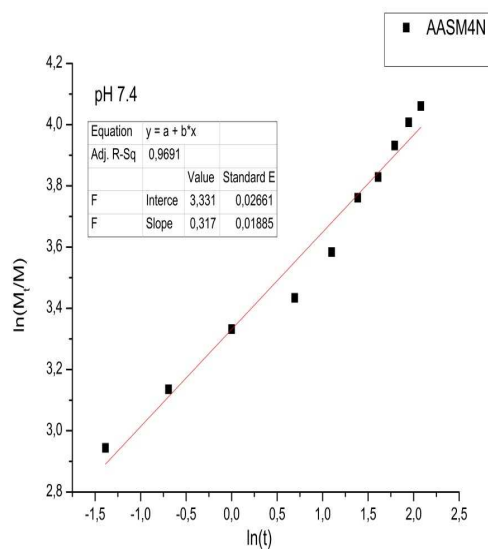


Figura A5- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM4N em pH 7.4.

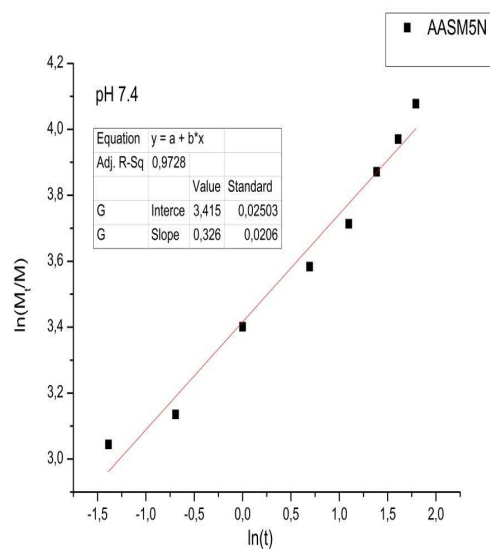


Figura A6- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM5N em pH 7.4.

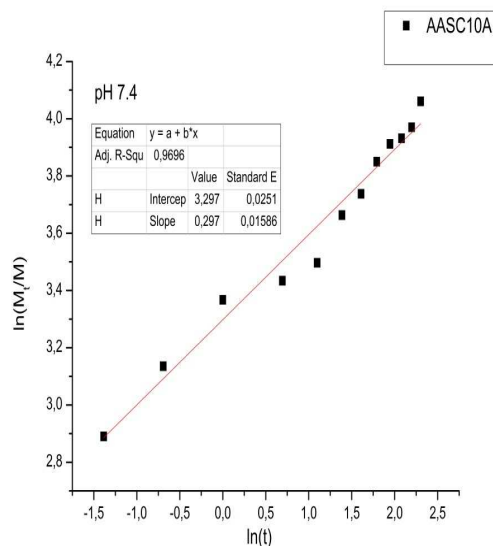


Figura A7- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC10A em pH 7.4.

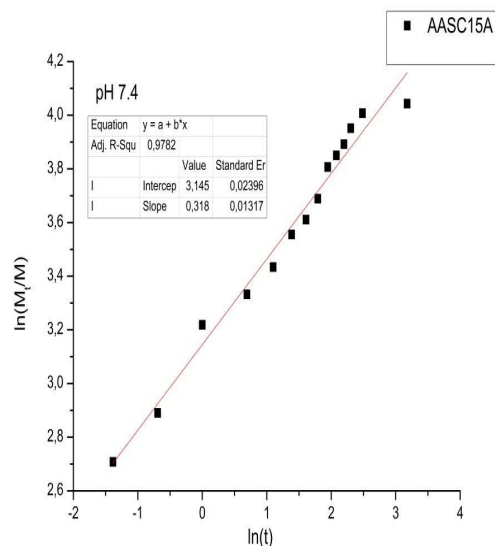


Figura A8- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC15A em pH 7.4.

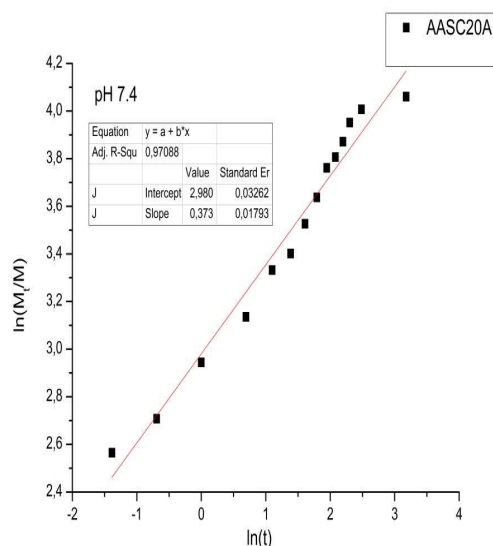


Figura A9- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC20A em pH 7.4.

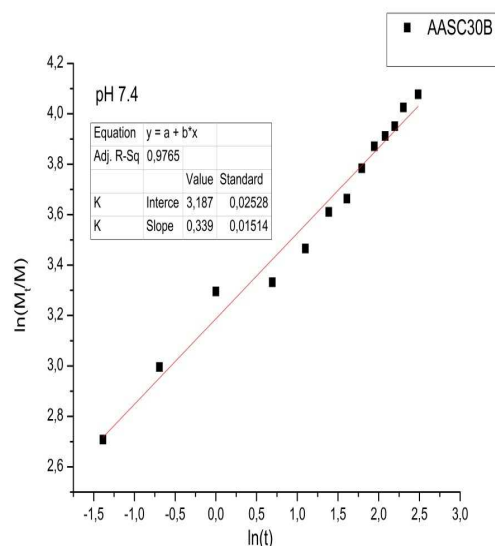


Figura A10- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC30B em pH 7.4.



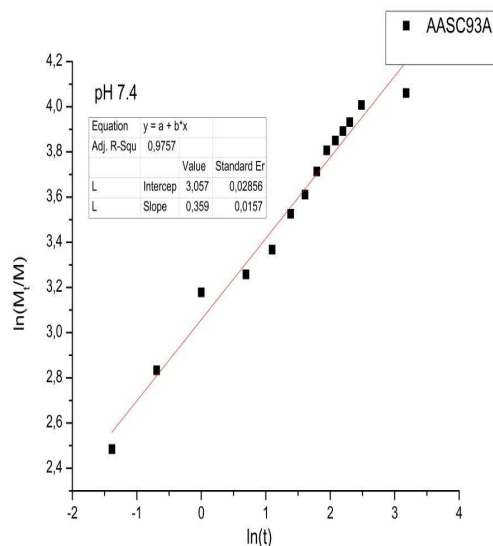


Figura A11- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC93A em pH 7.4.

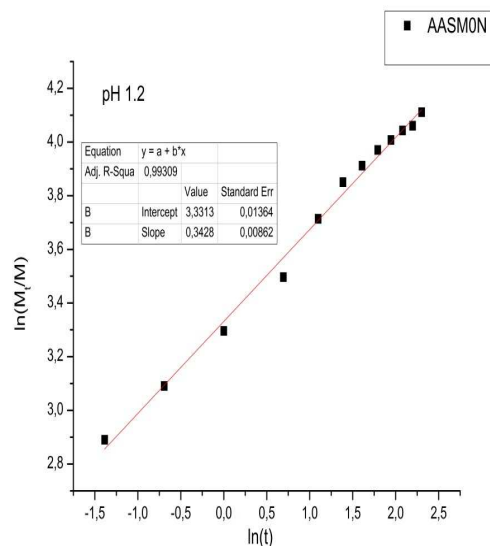


Figura A12- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM0N em pH 1.2.

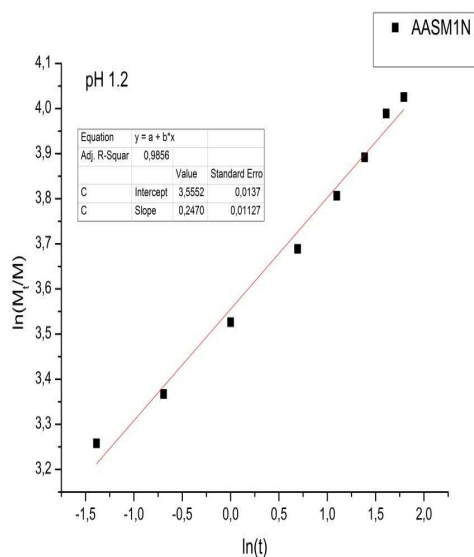


Figura A13- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM1N em pH 1.2.

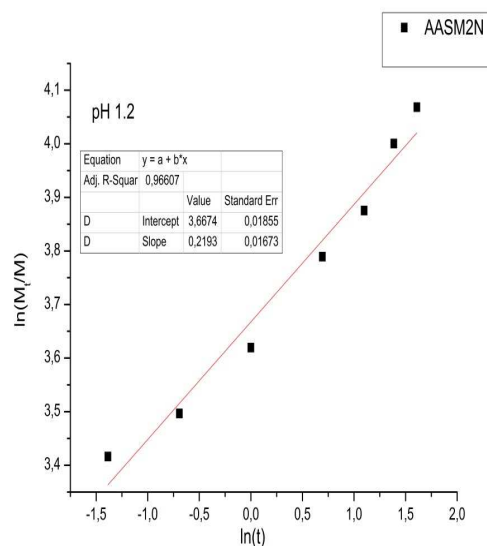


Figura A14- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM2N em pH 1.2.

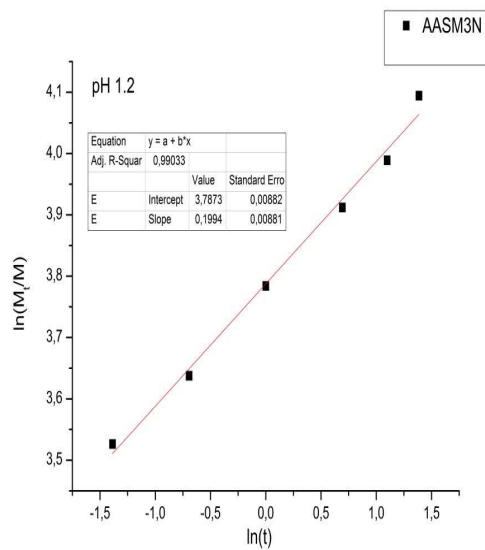


Figura A15- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM3N em pH 1.2.

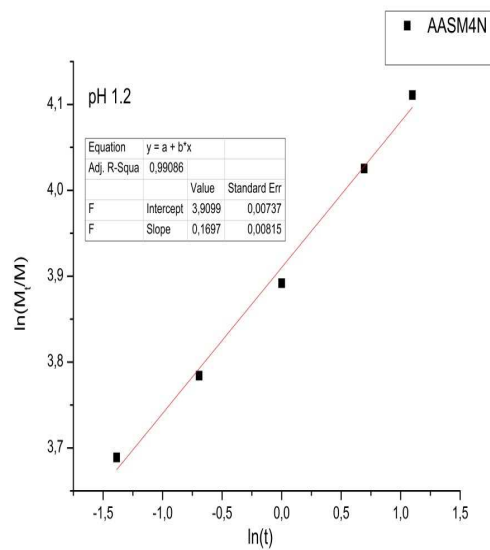


Figura A16- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM4N em pH 1.2.

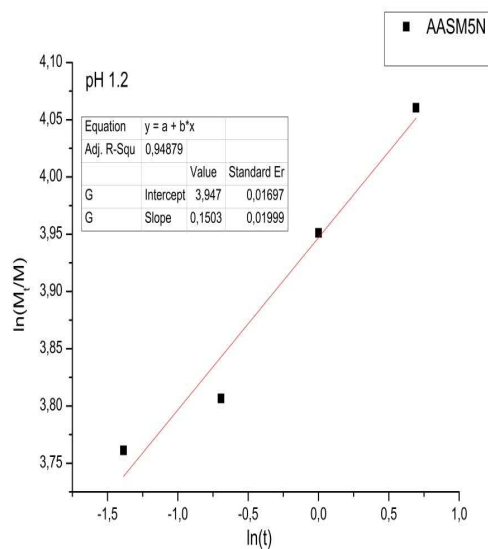


Figura A17- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASM5N em pH 1.2.

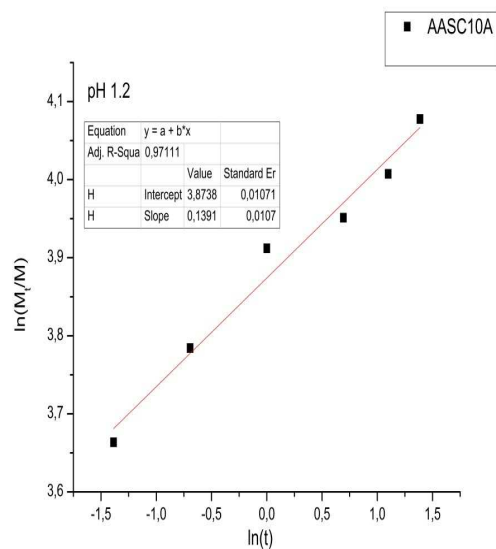


Figura A18- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC10A em pH 1.2.

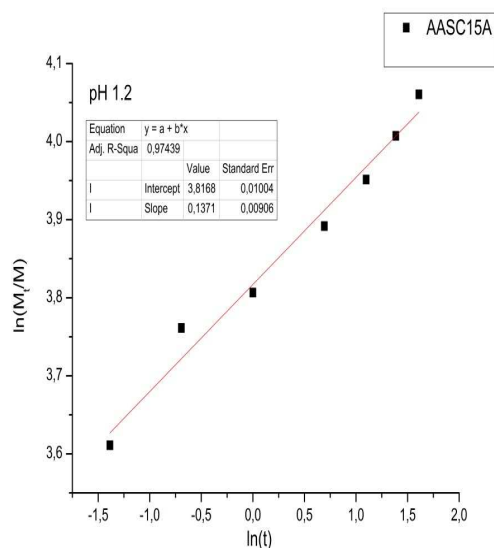


Figura A19- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC15A em pH 1.2.

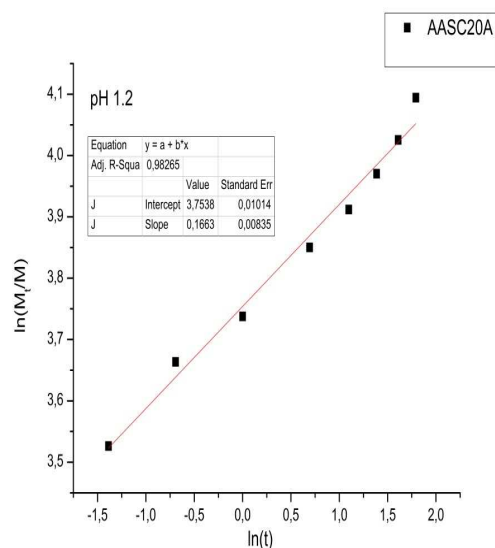


Figura A20- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC20A em pH 1.2.

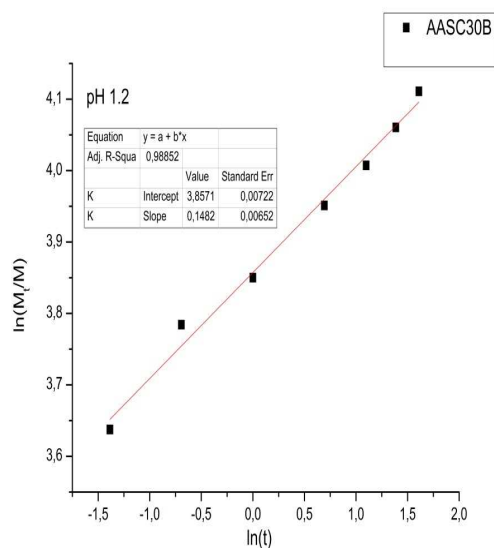


Figura A21- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC30B em pH 1.2.

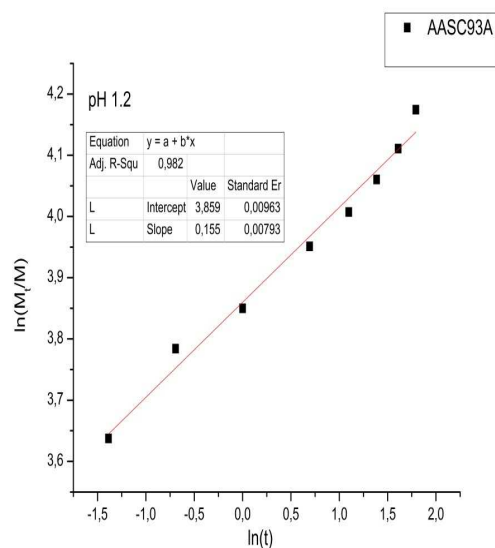


Figura A22- Regressão linear de  $\ln(M_t/M)$  em função de  $\ln(t)$  para obtenção do expoente difusional da amostra AASC93A em pH 1.2.

